

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001199

International filing date: 28 January 2005 (28.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-022739
Filing date: 30 January 2004 (30.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

31. 1. 2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 1月30日

出願番号 Application Number: 特願2004-022739

[ST. 10/C]: [JP2004-022739]

出願人 Applicant(s): 麒麟麦酒株式会社

2005年 3月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋

【書類名】 特許願
【整理番号】 2003-0095
【提出日】 平成16年 1月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C08B 37/00
C07K 16/16
C12P 21/08
C12C 11/00
G01N 33/53

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 キリンビール株式会社
基盤技術研究所内
【氏名】 小川 俊也

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 キリンビール株式会社
基盤技術研究所内
【氏名】 小泉 英樹

【特許出願人】
【識別番号】 000253503
【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社
【代表者】 荒蒔 康一郎

【代理人】
【識別番号】 100107984
【弁理士】
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】
【識別番号】 100102255
【弁理士】
【氏名又は名称】 小澤 誠次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118957
【弁理士】
【氏名又は名称】 岡 晴子

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 044347
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0206725

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から単離し得、酵母早期凝集活性を有する多糖類であつて、下記の物理化学的性質を有する早凝因子、又は該早凝因子を多糖類分解酵素で分解し、精製した酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子分解物：

- 1) ゲルfiltrationクロマトグラフィー法により、デキストラン40,000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下であり、
- 2) アラビノース、ガラクトース及びキシロースを主要構成糖とする多糖類であり、
- 3) 少なくとも、 $(\rightarrow 4 X y 1 1 \rightarrow)$ 連結のキシロース単位、 $(\rightarrow 5 A r a 1 \rightarrow)$ 連結のアラビノース単位、 $(\rightarrow 3 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、 $(\rightarrow 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、及び $(\rightarrow 3, 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位を含有する。

【請求項 2】

早凝因子の多糖類が、少なくとも、 $(\rightarrow 4 X y 1 1 \rightarrow)$ 連結のキシロース単位、 $(\rightarrow 5 A r a 1 \rightarrow)$ 連結のアラビノース単位、 $(\rightarrow 3 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、 $(\rightarrow 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、及び $(\rightarrow 3, 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位を含有し、更に、 $(\rightarrow 2 R h a 1 \rightarrow)$ 連結のラムノース単位、 $(\rightarrow 2, 4 R h a 1 \rightarrow)$ 連結のラムノース単位、及び非還元末端のアラビノース単位、キシロース単位、ガラクトース単位、グルコース単位、マンノース単位を含有することを特徴とする請求項1記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項 3】

早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から単離し得、酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子の物理化学的性質において、ゲルfiltrationクロマトグラフィー法により、デキストラン40,000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約40,000以下であることを特徴とする請求項1又は2記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項 4】

ゲルfiltrationクロマトグラフィー法により、デキストラン5,000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項 5】

早凝因子の多糖類分解酵素分解物が、早凝因子のアスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素の分解物であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項 6】

早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、醸造用酵母に吸着して回収され、該回収酵母を洗浄、抽出して得た高分子画分を、アニオン交換クロマトグラフィーで精製し、除タンパク後、レクチンカラムクロマトグラフィーで精製することにより得られる、1) ゲルfiltrationクロマトグラフィー法により、デキストラン40,000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下であり、2) アラビノース、ガラクトース及びキシロースを主要構成糖とする酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子、又は該早凝因子を多糖類分解酵素で分解し、精製した酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子分解物。

【請求項 7】

早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、醸造用酵母に吸着して回収され、該回収酵母を洗浄、抽出して得た高分子画分を、アニオン交換クロマトグラフィーで精製し、除タンパク後、レクチンカラムクロマトグラフィーで精製することにより得られる早凝因子が、ゲルfiltrationクロマトグラフィー法により、デキストラン40,000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約40,000以下であることを特徴とする請求項6記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項 8】

ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン5、000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下であることを特徴とする請求項6記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項9】

ハイブリドーマP F H K-1 (F E R M B P - 0 8 6 0 2) 株が產生する抗体が認識することを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物。

【請求項10】

早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、早凝因子含有物質を醸造用酵母に吸着して回収し、該回収酵母を水洗浄した後、段階的に濃度を調整したN a C 1 溶液で酵母表層から溶出した酵母早期凝集活性含有高分子画分を、アニオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、酵母早期凝集活性含有画分からタンパク質成分を除去した後、更にレクチンカラムで精製し、酵母早期凝集活性を含有する多糖類を取得することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の早凝因子の製造方法。

【請求項11】

請求項10記載の早凝因子を、アスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素で分解し、該分解物をアニオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、デキストラン5、000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下の、酵母早期凝集活性を含有する多糖類を取得することを特徴とする請求項請求項1～9のいずれか記載の早凝因子分解物の製造方法。

【請求項12】

請求項1～9記載の早凝因子又は早凝因子分解物に結合する抗体。

【請求項13】

抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の抗体。

【請求項14】

抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の抗体。

【請求項15】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマP F H K-1 (F E R M B P - 0 8 6 0 2) 株が產生するモノクローナル抗体である請求項14記載の抗体。

【請求項16】

請求項14又は15記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

【請求項17】

ハイブリドーマP F H K-1 (F E R M B P - 0 8 6 0 2) 株である請求項16記載のハイブリドーマ。

【請求項18】

請求項1～9のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程において添加し、酵母の凝集・沈降を誘発することによって発酵を停止することを特徴とする醸造における発酵工程の調節方法。

【請求項19】

請求項1～9のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程終了時又は終了後において添加し、酵母の凝集・沈降を促進することを特徴とする醸造発酵液の清澄促進方法。

【請求項20】

請求項12～15のいずれか記載の抗体を用いて、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、早凝因子を吸着、分離することを特徴とする早凝因子の精製、取得方法。

【請求項21】

請求項12～15のいずれか記載の抗体を用いて、発酵麦芽飲料の醸造における麦汁又は発酵液から、早凝因子を吸着、除去することを特徴とする醸造における麦汁又は発酵液からの早凝因子の除去方法。

【請求項22】

請求項12～15のいずれか記載の抗体を用いて、醸造原料における早凝因子の存在を検

知、測定することを特徴とする、醸造原料の早凝性の判定方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】酵母早凝因子、その抗体、及びそれらの利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、発酵麦芽飲料等の醸造における発酵工程において、酵母の早期凝集現象を発生する原因物質である、醸造原料中に含まれる早凝因子（酵母早期凝集因子）、その抗体、及びそれらの利用に関する。

【背景技術】

【0002】

ビールや発泡酒、或いはウイスキーなどの発酵麦芽飲料等の醸造においては、酵母による主発酵の終了時に、酵母が適度に凝集沈降する。この凝集沈降により発酵が停止し、沈降した酵母の回収が可能となる。このように、発酵麦芽飲料等の醸造において、正常な発酵工程においては、酵母の凝集、沈降は酵母による主発酵の終了時に、発酵液のエキスが少なくなった時点に適度に起こるが、この酵母の凝集、沈降について「早期凝集現象」と呼ばれる現象が観察されることが報告されている。この「早期凝集現象」とは、酵母による発酵工程、特に発酵後期に、酵母の資化可能な糖分がまだ発酵液中に残っているにもかかわらず、酵母が凝集して沈降してしまう現象のことをいい、この早期凝集現象により、酵母が凝集・沈降してしまうと発酵の進行が早期に停止してしまう。したがって、この現象が見られると、発酵が不十分となり、製造された製品が規格外のものとなり、発酵麦芽飲料等の醸造において、大きな損害を蒙ることにもなる。

【0003】

酵母の凝集は、発酵の終期になりエキスが少なくなると酵母がお互いに塊となって起こり、この凝集により通常酵母は培養液より底に沈降するが、この酵母の凝集には酵母細胞表層のレクチン様タンパク質と酵母マンナンのマンノース糖鎖の結合の関与等が報告されている（Appl. Microbiol. Biotechnol., 61:197-205, 2003）酵母の凝集については、現在までに、多くの研究が行われ、報告されている。

【0004】

酵母の凝集が発酵工程の終了前の、早期に起こる早期凝集現象についても、古くから多くの研究が進められ、この問題を解決すべく、その原因の解明が行われてきた。その結果、この早期凝集現象は、麦芽中に含まれる高分子酸性多糖が原因であることがほぼ突き止められた（J. Inst. Brew., 97, 359-366, 1991；日本農芸化学会誌, 71, 381, 1997）。しかしながら、この早期凝集現象を引き起こす原因となる早凝因子については、多糖という性質上その分離、精製が難しいという理由（多糖の分離・精製法 生物化学実験法 20 学会出版センター）や麦芽等の醸造原料に含まれる量の希薄性から、物質として精製、単離することが極めて困難となっていた。したがって、上記研究報告の中では、早凝因子の多糖類については部分的な精製が試みられているものの、物質としての精製、単離はできていない状況であった。このような状況から、早凝因子の分子構造、特に、活性に重要なコア構造等、早凝因子の実体については、全く解明がなされなかった。

【0005】

近年、この早凝因子が、原料麦に由来し、麦芽中に含まれる高分子酸性多糖類であることが明らかにされ、この因子は、麦芽の製麦工程において生成するものではなく、原料麦中にもともと存在しているものであることが明らかにされていたが（特開平10-179190号公報）、最近になって、早凝因子は、原料麦中にすでに存在する場合と、製麦工程中に生成する場合のいずれもあることが明らかにされた。しかし、上記のように、早凝因子は物質としての精製、単離がなされておらず、その詳細については、解明がなされていない状況の下にあったため、発酵麦芽飲料等の醸造に際して、早凝因子を物質の面からコントロールするということはできず、発酵麦芽飲料等の醸造において、発酵工程の早期凝集現象の問題を回避するためには、予め醸造原料について発酵試験を行い（K. Morimoto, et.al., Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., ltd., 18, 63, 1975）、醸造原料中の早凝因子の有無について評価した上で、醸造原料の選択を行って対応していたのが現状である

。したがって、発酵液から早凝因子を消失させて、酵母の早期の凝縮、沈殿を回避したり、或いは、逆に発酵の終了した発酵液に、早凝因子を添加して、酵母の凝集、沈殿を促進するような発酵工程のコントロール等の考えも全くなかったのが実状である。更に、現在も、早凝因子の抗体の取得やその利用も全くなされていない。

【0006】

【特許文献1】特開平10-179190号公報。

【非特許文献1】Appl. Microbiol. Biotechnol., 61:197-205, 2003。

【非特許文献2】J. Inst. Brew., 97, 359-366, 1991。

【非特許文献3】日本農芸化学会誌、71、381, 1997。

【非特許文献4】K. Morimoto, et.al., Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., ltd., 18, 63, 1975。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、ビールや発泡酒或いはウイスキーなどの発酵麦芽飲料等の醸造における発酵工程において、酵母の早期凝集現象を発生する原因物質である、大麦や麦芽等の醸造原料中に含まれる早凝因子（酵母早期凝集因子）を精製、単離し、提供すること、及び、該早凝因子の早凝活性を有する多糖類分解酵素分解物、又は該早凝因子或いは該酵素分解物の抗体を取得して提供すること、更には、それらの利用方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、ビールや発泡酒或いはウイスキーなどの発酵麦芽飲料等の醸造における発酵工程において、酵母の早期凝集現象を発生する原因物質である醸造原料中に含まれる早凝因子（酵母早期凝集因子）について鋭意研究する中で、早凝性を有する大麦や麦芽に含まれる早凝因子が、醸造用酵母に吸着させて回収することにより、希薄な含量で含有される早凝因子を効果的に回収することが可能であり、更に、かかる方法で回収した早凝因子を、アニオン交換カラムクロマトグラフィーや、レクチンカラムクロマトグラフィーのような特定のクロマトグラフィーを用いて分離、精製することにより、従来、その精製、単離が困難であった早凝因子の精製、単離ができることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

詳述すると、本発明者は、非早凝及び早凝麦芽からの麦汁で発酵させた際の回収酵母を顕微鏡下で観察した結果、早凝麦汁の回収酵母の凝集塊が明らかに大きくなっていることを確認した（図1）。発酵過程で形成された凝集酵母が早凝因子によって接着された結果、大きな塊になっていると考えられた。これらの現象から本発明者は、早凝因子は醸造用酵母の表層に何らかの形で吸着しており、早凝麦芽を用いて発酵させた際の回収酵母から早凝因子を簡便に、効率良く回収できると想定した。そこで、早凝麦芽50kgを用いた200Lの試験醸造によって得られた早凝因子を吸着させた回収酵母を、超純水、0.1M、0.5M、1.0M濃度のNaCl溶液で順次洗浄し、洗浄液を回収した結果、早凝麦芽に含有される早凝因子を、簡便に、効率良く回収できることを確認した。

【0010】

更に、該NaCl溶液により溶出された早凝活性の検出された画分を、透析し、該透析した高分子画分をアニオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、該カラムからの早凝活性の検出された画分を、タンパク質を除去した後、レクチンカラムクロマトグラフィーで精製した結果、アラビノース、ガラクトース、キシロースを主要構成糖とする酵母早凝活性を有する多糖類を精製、単離することに成功した。

【0011】

本発明は、上記のような方法で精製、単離された早凝因子からなるもので、本発明の早凝因子は、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下であり、かつ、少なくとも、(→4Xy

11→) 連結のキシロース単位、(→5 Ara 1→) 連結のアラビノース単位、(→3 G a 1 1→) 連結のガラクトース単位、(→6 Gal 1 1→) 連結のガラクトース単位、及び(→3, 6 Gal 1 1→) 連結のガラクトース単位を含有する多糖類であり、大麦や麦芽のような醸造原料に含まれる早凝因子を多糖類物質として完全な形で精製、単離することに成功したものである。国内産の大麦や麦芽から精製された早凝因子の推定分子量は、ゲルfiltrationクロマトグラフィー法により、デキストラン40,000を標準多糖類とした場合の推定分子量で約40,000以下である。該早凝因子は、現在までに知られている最も精製度の高い部分粗精製物よりも20倍以上の精製度のアップになるものである。

【0012】

本発明は、更に、本発明で精製、単離した早凝因子をその活性を失うことなく酵素的に分解し、早凝活性に重要なコア構造体のみを保存した早凝因子の酵素分解物を包含する。すなわち、早凝因子を、アスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素(Sanzyme 1000:三共株式会社)のような分解酵素で分解し、該分解物をアニオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、早凝活性を有する画分を精製、分離することにより、デキストラン5,000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下の、酵母早期凝集活性を含有する多糖類を取得することができる。該早凝因子の酵素分解物のコア構造体は、現在までに報告のない特殊な多糖類であり、その比活性は分解する前の早凝因子の比活性に比べて2.5倍以上高い値が示された。

【0013】

本発明の早凝因子及び該早凝因子の酵素分解物の精製、単離に際しては、その分離した画分の早凝活性の検出、測定のために、この発明と同時に本発明者が開発した酵母早凝因子の迅速測定法を用いることができる(特願2004-22532)。該測定法は、対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製し、該酵母と、麦や麦芽等の被検原料サンプルの水抽出高分子画分とを、バッファー液中で混合、懸濁し、該混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定することにより、従来法のような発酵工程を経ることなく、サンプル中に含まれる早凝因子を極めて短時間に測定することが可能な方法であり、少量のサンプルでも測定が可能であることから、本発明における精製画分の早凝活性の検出、測定に極めて効果的に用いることができる。

【0014】

更に、本発明は、本発明の早凝因子又はその酵素分解物を抗原として取得した該早凝因子及びその酵素分解物と特異的に結合する抗体を包含する。該抗体には、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体があり、該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマPFHK-1は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにブダペスト条約に基く国際寄託として寄託されており、受託番号FERM BP-08602が付与されている。

【0015】

本発明は、更に、本発明で取得した早凝因子又はその酵素分解物、更にはこれらの抗体の利用方法を包含する。本発明の早凝因子又はその酵素分解物の利用方法としては、該早凝因子又はその酵素分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程において添加し、酵母の凝集・沈降を誘発することによって発酵を停止することにより、醸造における発酵工程の調節を行う方法が挙げられる。また、本発明の早凝因子又は早凝因子分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程終了時又は終了後において添加し、酵母の凝集・沈降を促進することにより醸造における発酵液の清澄を促進する方法を挙げることができる。

【0016】

本発明で早凝因子又はその酵素分解物を抗原として取得した抗体の利用方法としては、該抗体を用いて、早凝性を有する大麦及び/又は麦芽から、早凝因子を吸着、分離することによる早凝因子の精製、取得方法、及び、該抗体を用いて、発酵麦芽飲料の醸造における麦汁又は発酵液から、早凝因子を吸着、除去することにより、醸造における麦汁又は発酵液から早凝因子を除去する方法、更には、該抗体を用いて、醸造原料における早凝因子の存在を検知、測定することにより、醸造原料の早凝性の判定を行う方法を挙げること

ができる。

【0017】

すなわち具体的には本発明は、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から単離し得、酵母早期凝集活性を有する多糖類であって、下記の物理化学的性質を有する早凝因子、又は該早凝因子を多糖類分解酵素で分解し、精製した酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子分解物：

- 1) ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下であり、
- 2) アラビノース、ガラクトース及びキシロースを主要構成糖とする多糖類であり、
- 3) 少なくとも、 $(\rightarrow 4 X y 1 1 \rightarrow)$ 連結のキシロース単位、 $(\rightarrow 5 A r a 1 \rightarrow)$ 連結のアラビノース単位、 $(\rightarrow 3 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、 $(\rightarrow 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、及び $(\rightarrow 3, 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位を含有する（請求項1）や、早凝因子の多糖類が、少なくとも、 $(\rightarrow 4 X y 1 1 \rightarrow)$ 連結のキシロース単位、 $(\rightarrow 5 A r a 1 \rightarrow)$ 連結のアラビノース単位、 $(\rightarrow 3 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、 $(\rightarrow 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位を含有し、更に、 $(\rightarrow 2 R h a 1 \rightarrow)$ 連結のラムノース単位、 $(\rightarrow 2, 4 R h a 1 \rightarrow)$ 連結のラムノース単位、及び非還元末端のアラビノース単位、キシロース単位、ガラクトース単位、グルコース単位、マンノース単位を含有することを特徴とする請求項1記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項2）や、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から単離し得、酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子の物理化学的性質において、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約40,000以下であることを特徴とする請求項1又は2記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項3）や、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン5、000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項4）や、早凝因子の多糖類分解酵素分解物が、早凝因子のアスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素の分解物であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項5）からなる。

【0018】

また本発明は、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、醸造用酵母に吸着して回収され、該回収酵母を洗浄、抽出して得た高分子画分を、アニオン交換クロマトグラフィーで精製し、除タンパク後、レクチンカラムクロマトグラフィーで精製することにより得られる、1) ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下であり、2) アラビノース、ガラクトース及びキシロースを主要構成糖とする酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子、又は該早凝因子を多糖類分解酵素で分解し、精製した酵母早期凝集活性を有する多糖類である早凝因子分解物（請求項6）や、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、醸造用酵母に吸着して回収され、該回収酵母を洗浄、抽出して得た高分子画分を、アニオン交換クロマトグラフィーで精製し、除タンパク後、レクチンカラムクロマトグラフィーで精製することにより得られる早凝因子が、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約40,000以下であることを特徴とする請求項6記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項7）や、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン5、000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下であることを特徴とする請求項6記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項8）や、ハイブリドーマPFHK-1（FERM BP-08602）株が産生する抗体が認識することを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物（請求項9）からなる。

【0019】

また本発明は、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、早凝因子含有物質を醸造用酵母に吸着して回収し、該回収酵母を水洗浄した後、段階的に濃度を調整したNaCl溶液

で酵母表層から溶出した酵母早期凝集活性含有高分子画分を、アニオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、酵母早期凝集活性含有画分からタンパク質成分を除去した後、更にレクチンカラムで精製し、酵母早期凝集活性を含有する多糖類を取得することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の早凝因子の製造方法（請求項10）や、請求項10記載の早凝因子を、アスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素で分解し、該分解物をアニオン交換カラムクロマトグラフィーで精製し、デキストラン5、000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下の、酵母早期凝集活性を含有する多糖類を取得することを特徴とする請求項請求項1～9のいずれか記載の早凝因子分解物の製造方法（請求項11）や、請求項1～9記載の早凝因子又は早凝因子分解物に結合する抗体（請求項12）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の抗体（請求項13）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の抗体（請求項14）や、モノクローナル抗体が、ハイブリドーマPFHK-1(FERM BP-08602)株が產生するモノクローナル抗体である請求項14記載の抗体（請求項15）や、請求項14又は15記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ（請求項16）や、ハイブリドーマPFHK-1(FERM BP-08602)株である請求項16記載のハイブリドーマ（請求項17）からなる。

【0020】

更に、本発明は、請求項1～9のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程において添加し、酵母の凝集・沈降を誘発することによって発酵を停止することを特徴とする醸造における発酵工程の調節方法（請求項18）や、請求項1～9のいずれか記載の早凝因子又は早凝因子分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程終了時又は終了後において添加し、酵母の凝集・沈降を促進することを特徴とする醸造発酵液の清澄促進方法（請求項19）や、請求項12～15のいずれか記載の抗体を用いて、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、早凝因子を吸着、分離することを特徴とする早凝因子の精製、取得方法（請求項20）や、請求項12～15のいずれか記載の抗体を用いて、発酵麦芽飲料の醸造における麦汁又は発酵液から、早凝因子を吸着、除去することを特徴とする醸造における麦汁又は発酵液からの早凝因子の除去方法（請求項21）や、請求項12～15のいずれか記載の抗体を用いて、醸造原料における早凝因子の存在を検知、測定することを特徴とする、醸造原料の早凝性の判定方法（請求項22）からなる。

【発明の効果】

【0021】

ビールや発泡酒或いはウイスキーなどの発酵麦芽飲料等の醸造における発酵工程において、発生する酵母の早期凝集現象は、製造される製品の品質に重大な影響を及ぼし、早期凝集現象への対応は、発酵麦芽飲料等の醸造において、重要な管理項目の一つとなっている。しかしながら、この早期凝集現象を引き起こす原因となる早凝因子については、従来、精製、単離が極めて困難であって、物質としての精製、単離がなされていない状況であったため、該早凝因子の分子構造等、物質としての解明が殆どなされておらず、そして、発酵麦芽飲料等の醸造におけるこれらの物質の検出やコントロールも進んでいない状況にあった。

【0022】

本発明の方法により、早凝因子の回収及び精製、単離が可能となり、物質として、精製、単離した早凝因子の提供が可能となったことにより、その物質の解明とともに、醸造原料に含有される物質の検出や判定が容易になり、また、発酵麦芽飲料等の醸造において、該物質をコントロールして、発酵工程の制御を行う等の、早凝因子の利用が可能となった。また、本発明の早凝因子の多糖類分解酵素による分解物は、早凝因子のコア構造をそのまま保存した、特殊な多糖類であり、高い比活性の早凝活性をもつ分解物として、提供されるものであり、本発明により、早凝因子が物質として、精製、単離されたことにより、該物質の提供が可能となった。更に、本発明において、早凝因子やその早凝活性をもつ酵素分解物が提供されたことにより、該早凝因子やその酵素分解物を抗原とした抗体を取得

することが可能となり、該抗体を用いて、醸造原料における早凝因子の検出や、発酵麦芽飲料等の醸造においての早凝因子の吸着除去、更には、該抗体を用いての醸造原料の早凝性の判定を行うことが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

(本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物)

本発明は、本発明の製造方法により醸造原料である大麦や麦芽から精製、単離された早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物からなる。

【0024】

本発明の早凝因子は、後に詳述する本発明の早凝因子の製造方法、すなわち、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽を原料とし、次の工程：1) 早凝因子を醸造用酵母に吸着させて回収し、その回収酵母に結合している物質を抽出する工程、2) 工程1) で得られた物質から高分子画分を得る工程、3) アニオン交換カラムで精製する工程、4) タンパク質成分を除去する工程、5) レクチンカラムで精製する工程、を含む調製方法により得られる早凝活性（早期酵母凝集活性）を有する多糖類で、アラビノース、ガラクトース、キシロースを主要構成糖とし、少なくとも、 $(\rightarrow 4 X y 1 1 \rightarrow)$ 連結のキシロース単位、 $(\rightarrow 5 A r a 1 \rightarrow)$ 連結のアラビノース単位、 $(\rightarrow 3 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、 $(\rightarrow 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、及び $(\rightarrow 3, 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位を含有し、更に、 $(\rightarrow 2 R h a 1 \rightarrow)$ 連結のラムノース単位、 $(\rightarrow 2, 4 R h a 1 \rightarrow)$ 連結のラムノース単位、及び非還元末端のアラビノース単位、キシロース単位、ガラクトース単位、グルコース単位、マンノース単位を含有する。本発明の早凝因子である多糖類は、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下である。国内産の大麦や麦芽から精製された早凝因子の推定分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量で約40,000以下である。

【0025】

本発明の早凝因子の多糖類分解酵素分解物は、本発明の早凝因子を多糖分解酵素、例えばアスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素 (Sanzyme 1000:三共株式会社; J. Bioch em. 97, 801-810, 1985) のような酵素によって断片化し、次の工程：1) アニオン交換カラムで精製する工程、2) 高分子画分を得る工程、3) レクチンカラムで精製する工程、を含む調製方法により得られる早凝活性（酵母早期凝集活性）を有する多糖類であり、該多糖類は、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン5、000を標準多糖類とした場合の早凝因子分解物の推定分子量が約5,000以下である。該早凝因子の酵素分解物は、早凝因子の活性に重要なコア構造をそのまま保持する。

【0026】

(本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物の製造方法)

本発明は、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物の製造方法を包含する。

【0027】

本発明の製造方法を用いて、本発明の早凝因子を精製、単離するには、まず、醸造用酵母を用いて、早凝性を有する大麦や麦芽に含まれる早凝因子を、吸着させて回収する。本発明に使用する醸造用酵母は酵母凝集性を有する酵母であればいずれの醸造用酵母でも良い。該早凝因子の吸着、回収は、例えば、早凝性を有する麦芽等を用いて麦汁を調製し、これに醸造用酵母を添加して発酵させた発酵液から、酵母を回収し、該回収した酵母を、NaCl溶液で、懸濁、洗浄することにより、早凝因子を溶出させ、該溶出液から高分子画分を取得するような方法で実施する。該NaCl溶液から高分子画分を得る手法としては、透析膜を利用した透析、限外ろ過膜を用いた手法、エタノール沈殿等が例示される。

【0028】

得られた高分子画分は、前記3) アニオン交換カラムで精製する工程、4) タンパク質成分を除去する工程、及び5) レクチンカラムで精製する工程、により早凝因子を精製、単離する。アニオン交換カラムによる精製については、特に限定されないが、好ましくは

Diethylaminoethyl (D E A E) をイオン交換体として利用するカラムが好ましい。タンパク質の除去工程についても、特に限定されないが、例えば、フェノールクロロホルム抽出、カチオン交換カラムの利用、プロテアーゼ等の酵素剤を用いたタンパク質の分解などが挙げられる。レクチンカラムを用いた精製についても使用するレクチンは該多糖類の結合能を有するレクチンである限りにおいては特に限定されることはないが、コンカナバリンA (ConA) を用いることが好ましい。

【0029】

本発明の製造方法を用いて、本発明の早凝因子の多糖類分解酵素分解物を調製するには、本発明の早凝因子を多糖類分解酵素によって断片化し、次の工程：1) アニオン交換カラムで精製する工程、2) 高分子画分を得る工程、3) レクチンカラムで精製する工程、を含む調製方法により、早凝活性（酵母早期凝集活性）を示す画分を、精製、分離する。該調製方法に用いる多糖類分解酵素としては、種々のものを用いることができるが、例えばアスペルギルス・オリーゼ多糖類分解酵素 (Sanzyme 1000 : 三共株式会社) のような酵素を好適な例として挙げることができる。該酵素分解物は、アニオン交換カラムで精製し、高分子画分を得た上で、レクチンカラムで精製するが、該アニオン交換カラム及びレクチンカラムによる精製や高分子画分の取得は、本発明の早凝因子の精製、単離に用いた前記のカラムや高分子画分の取得手段を用いることができる。例えば、高分子画分の取得手段としては、透析膜を利用した透析、限外ろ過膜を用いた手法、エタノール沈殿等が例示される。

【0030】

本発明の早凝因子及び該早凝因子の酵素分解物の精製、単離に際しては、その分離した画分について、早凝活性の検出、確認を行うことが必要となる。該早凝活性の検出、確認のために特に適合する方法として、この発明と同時に本発明者が開発した酵母早凝因子の迅速測定法を挙げることができる（特願2004-22532）。該測定法は、対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製し、該酵母と、麦や麦芽等の被検原料サンプルの水抽出高分子画分とを、バッファー液中で混合、懸濁し、該混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定することによるものであるが、該測定方法により、分画したサンプル中に含まれる早凝因子を極めて短時間に測定することが可能であり、かつ、少量のサンプルでも測定が可能であることから、本発明における精製画分の早凝活性の検出、測定に極めて有効に用いることができる。

【0031】

(本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物の抗体)

本発明は、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物の抗体を包含する。

本発明の抗体は、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物である多糖類に反応し得る限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであっても良い。ポリクローナル抗体は、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物である多糖類を免疫原として用いて常法に従って調製することができる。また、一般に多糖類は抗原として認識されにくい特徴を有するため（「入門免疫学」川西信彦ら編、講談社サイエンティフィック）、多糖を何らかのキャリア（例えばBSA, KLH, OVA等のタンパク質）にコンジュゲートさせ（例えばJones, L. et.al., Plant Physiol. 113, 1405-1412の方法により）、それを免疫原として用いることもできる。例えば、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物である多糖類で免疫した動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ等）の血清免疫グロブリンから、抗原アフィニティカラムを用いて調製できる。

【0032】

モノクローナル抗体は、例えば以下の工程により作製することができる：(1) 抗原の調製、(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取、(3) 細胞融合、(4) ハイブリドーマの選択、スクリーニング及びクローニング、(5) モノクローナル抗体の採取。以下、各工程について説明する。

【0033】

<抗原の調製及び免疫及び抗体産生細胞の採取>

抗原の調製に用いる多糖類としては、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物である多糖類、又は、その精製途中の多糖類を用いることができる。また、上記多糖類をキャリア（例えばBSA、KLH、OVA等のタンパク質）にコンジュゲートさせ、抗原として用いすることもできる。

【0034】

免疫及び抗体産生細胞の採取を行うには、上記のようにして得られた多糖類、若しくは、多糖類とキャリアをコンジュゲートさせたものを免疫原として、アジュバントとともに哺乳類、鳥類等に投与する。ここで、アジュバントとしては、市販のフロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、BCG、ハンターズ、タイターマック、キーホールリンペットヘモシアニン含有オイル等が挙げられ、これらを単独で使用しても良いし、これらの2種類以上を混合して使用しても良い。哺乳類としては、ウマ、サル、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ハムスター、マウス等を使用でき、鳥類としては、ハト、ニワトリ等を使用できるが、特にマウス、ハムスター等を使用するのが好ましい。

【0035】

投与の方法としては、公知の何れの方法を使用しても良く、例えば、静脈内投与、皮下投与、または腹腔内投与を使用できる。抗原の免疫量は1回にマウス1匹あたり、通常5～1000μg、好ましくは5～50μgである。免疫の回数は、通常1～8回、好ましくは4～8回である。最終免疫日から2～10日後に抗体産生細胞を採取する。採取する抗体産生細胞としては、リンパ節細胞、脾臓細胞等が挙げられるが、好ましくは脾臓細胞である。

【0036】

<細胞融合>

抗体産生細胞と細胞融合させるミエローマ細胞としては、マウス、ラット、ヒト等の種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能である株化細胞を使用できる。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地（例えばHAT培地）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ選択培地で生存できる性質を有するものが好ましい。一般的には、8-アザグアニン耐性株を使用できる。この細胞株は、ヒポキサンチングアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼを欠損し (HPRT⁻)、HAT培地中では生育できない。

【0037】

このようなミエローマ細胞としては、P3X63Ag8U1、P3-X63Ag8、P3/NS1/1-Ag4-1、P3 X63Ag8.653、Sp2/0-Ag14、Sp2/0/F0-2等のマウスマイエローマ細胞株、210.RCY.Ag1.2.3等のラットミエローマ細胞株、SKO-007等のヒトミエローマ細胞株等を使用できる。細胞融合は、例えば、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを混合比1：5～1：10の割合で、RPMI1640培地等の培地中で融合促進剤存在下、室温で1～7分間細胞同士を接触させることによって行うことができる。この際、融合促進剤として、平均分子量1000～5000のポリエチレンギリコール、ポリビニルアルコール等を使用できる。また、センダイウイルス等の融合ウイルスを使用しても良い。

【0038】

<ハイブリドーマの選択、スクリーニング及びクローニング>

細胞融合後、ハイブリドーマを選択する。ハイブリドーマの選択方法は、通常の方法に従えば良く、特に限定されない。ハイブリドーマの選択は、例えば、ハイブリドーマを選択培地（例えばHAT培地）で培養することにより行うことができる。この際の培養は、常法に従えば良く、特に限定されない。通常は、37℃で3～7日間培養すれば良い。目的のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングは、例えば、次の方法によって行うことができる。市販のELISA用マイクロプレートの各ウェルに、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物である多糖類を吸着させた後、BSAあるいはブロックエース（大日本製薬）等でブロッキングする。

【0039】

該マイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマの培養上清を加え、室温～37℃で1～2時間放置する。これを1×PBS（－）（Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines（－））／0.05% Tween 20で洗浄した後、適当に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗イムノグロブリンを加える。1×PBS（－）／0.05% Tween 20で洗浄した後、o-Phenylenediamine (SIGMA) を用いて西洋ワサビペルオキシダーゼの活性を測定し、西洋ワサビペルオキシダーゼの呈色を有するウェルを、本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物である多糖類に結合する抗体を產生する細胞を含むウェルとする。これによつて目的のハイブリドーマをスクリーニングすることができる。

【0040】

このウェルから目的とするハイブリドーマをクローニングする方法は、通常の方法に従えば良く、特に限定されない。ハイブリドーマのクローニング法は、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリングル法、蛍光励起セルソーター法等により行うことができる。本発明の実施例で取得されたハイブリドーマP F H K-1は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにブダペスト条約に基く国際寄託として寄託されており、受託番号F E R M B P-08602が付与されている。

【0041】

<モノクローナル抗体の採取>

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等を用いることができる。細胞培養法においては、例えば、ハイブリドーマを仔ウシ血清含有RPMI1640培地、MEM培地、E-RDF培地、または、無血清培地等の動物細胞培地中で、通常の培養条件（例えば、37℃、5% CO₂濃度）で3～7日間培養し、その培養上清から目的とするモノクローナル抗体を取得できる。

【0042】

腹水形成法においては、例えば、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）等の鉱物油を投与し、その後、ハイブリドーマ1×10⁶～1×10⁷個、好ましくは2×10⁶個を腹腔内に投与する。投与した哺乳動物を1～2週間、好ましくは10日間、飼育した後、腹水または血清を採取することにより目的とするモノクローナル抗体を取得できる。該抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合には、硫酸塩分析法、DEAE-セルロース等の陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインAセファロース等を用いるアフィニティーコロマトグラフィー、分子量や構造によってふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィー等の公知の方法を適宜に選択し、これらを単独で、または、組み合わせて使用することにより精製を行うことができる。採取したモノクローナル抗体が目的とするモノクローナル抗体であることの確認は、例えば、上記ハイブリドーマのスクリーニングの項において記載したと同様にして行うことができる。

【0043】

(本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物の利用)

本発明は、本発明で取得した早凝因子又はその多糖類分解酵素分解物の利用方法を包含する。本発明の早凝因子又はその多糖類分解酵素分解物の利用方法としては、該早凝因子又はその酵素分解物の酵母の凝集・沈降作用を利用して、該物質を発酵工程の適宜の時期に添加し、発酵工程のコントロールや、発酵液の清澄化を行う方法を挙げることができる。すなわち、該早凝因子又はその酵素分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程において添加し、酵母の凝集・沈降を誘発することによって発酵を停止することにより、醸造における発酵工程の調節を行う方法、或いは、本発明の早凝因子又はその酵素分解物を、発酵麦芽飲料の醸造における発酵工程終了時又は終了後において添加し、酵母の凝集・沈降を促進することにより醸造における発酵液の清澄を促進する方法を挙げることができる。

【0044】

(本発明の早凝因子及びその多糖類分解酵素分解物の抗体の利用)

本発明は、本発明で取得した早凝因子又はその多糖類分解酵素分解物を抗原として取得

した抗体の利用方法を包含する。該抗体には、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体があるが、該抗体の利用方法としては、該抗体の抗原抗体反応や、該抗体の早凝因子の吸着作用を利用して醸造原料からの早凝因子の精製、取得や、発酵液からの早凝因子の吸着、除去、又は醸造原料における早凝因子の検出、測定を挙げることができる。すなわち、本発明の抗体を用いて、早凝性を有する大麦及び／又は麦芽から、早凝因子を吸着、分離することにより早凝因子の精製、取得を行う方法、及び、該抗体を用いて、発酵麦芽飲料の醸造における麦汁又は発酵液から、早凝因子を吸着、除去することにより、醸造における麦汁又は発酵液から早凝因子を除去する方法、更には、該抗体を用いて、醸造原料における早凝因子の存在を検出、測定することにより、醸造原料の早凝性の判定を行う方法を挙げることができる。

【0045】

本発明の抗体を用いて醸造原料における早凝因子の存在を検出するには、抗体を用いた公知の免疫学的測定法を用いて実施することができる。該免疫学的測定法としては、例えばRIA法、ELISA法、蛍光抗体法等の公知の免疫学的測定法を挙げることができる。また、本発明の抗体を用いて、発酵液から早凝因子を吸着、除去するには、本発明の抗体を適宜担体に固定して、不溶化することにより、実施することができる。

【0046】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0047】

A. 早凝国産麦芽の発酵液回収酵母を用いた早凝因子粗抽出物の回収

早凝多糖の精製方法は、図2に模式化されている。以下は、その詳細な精製方法である。

【0048】

従来知られている手法（例えばK.Morimoto, et.al. Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 18, 63 (1975) 参照）によって早凝麦芽と判定された日本国産麦芽（以下、早凝国産麦芽と記す）50kgから常法に従って200Lの麦汁を作成した。次いでその麦汁を用いて常法に従って醸造用酵母を添加し発酵液を得た。その発酵液中より酵母を回収し、早凝国産麦芽発酵液回収酵母4Lを得た。次いでその回収酵母を超純水6Lにより懸濁洗浄し、日立冷却遠心機R P R 9-2ローター用遠沈管に移し、4,000rpm、5分(4°C)の遠心により酵母を沈殿させた。遠心分離後上清を回収し、水溶出画分とした。

【0049】

沈殿した酵母は次に0.1M NaClにより懸濁洗浄し、同様に酵母を遠心分離して上清を0.1M NaCl溶出画分とした。一連の操作を、0.5M NaCl、1.0M NaClについても順次実施し、それぞれ0.5M NaCl、1.0M NaCl溶出画分とした。それぞれの溶出画分について、一部を透析膜(Spectra/Por 1 MWC0 6,000-8,000(フナコシ))を用いて超純水に対して透析後、早凝活性の有無を下記の手法に従って判定した。

【実施例2】

【0050】

B. 早凝活性の判定法

(1) 試験用酵母の培養

YEPG培地(1% Yeast Extract、2% Bacto pepton、7.5% Maltose、2.5% Glucose)で、20°C静置培養で3日間培養した前培養液を、あらかじめ8°Cに冷却しておいたYEPG培地(通常は250ml容メディウムビンに培地100ml)に1.5%濃度で添加し、スターラーで攪拌しながら8°Cで培養した。培養時、経時的にOD600を測定し、酵母の増殖曲線を作成し、定常期になった直後(培養開始4日目)に酵母の培養を終了した。

【0051】

(2) 試験用酵母の調整

培養の終了した酵母を、3000 rpm、5分(4°C)の遠心により回収した。回収した酵母は、冷水により懸濁洗浄し、同様に遠心により回収し、冷却した100 mM EDTA(pH 8.0)によって懸濁洗浄2回、冷水による懸濁洗浄2回行い、20 mlの冷水に懸濁させた。酵母液を1/200希釈し、OD 600を測定することにより酵母濃度を測定した。

【0052】

(3) 麦汁エタノール沈殿物画分の調整

測定の際のコントロールとして、非早凝及び早凝国産麦芽から調製した麦汁のエタノール沈殿物画分を用いた。各種麦汁からのエタノール沈殿物は以下の手法に従って調整した。麦芽10 g或いは50 gを粗粉碎し、もろみ濃度1:6で調整したコングレス麦汁(45°C:30分→1°C/1分→70°C:60分後、ろ過)を遠沈管に移し、終濃度50%にエタノールを添加した。8000 rpm、10分(4°C)の遠心により沈殿を回収し、20 ml/50 g麦芽(4 ml/10 g麦芽)の熱水で懸濁させた。懸濁液を50 ml容チューブに移し、水で25 ml/50 g麦芽(5 ml/10 g麦芽)にfill upし、8000 rpm、10分(20°C)の遠心により不要物を取り除き、上清をそれぞれの測定サンプルとした。

【0053】

(4) 活性測定

分光光度計に使用するプラスティックキュベット(10×10×45mm)に、

100 mM酢酸ナトリウム(pH 4.8) : 1.5 ml

各種サンプル : 0.4 ml

50%塩化カルシウム : 6 μl

酵母液 : 2)で測定したOD 600値から3になる
ように計算

水 : 全量で3 mlになるように調整

のように調整し、パラフィルムで上部をシールし、40回上下に激しく混合した後、30分間室温で放置した。その後、沈降した酵母凝集物を爪ではじいて分散させ、測定に供したすべてのサンプルを同時に、緩やかに上下に4回混合させ、2分後にOD 600により濁度を測定した。測定したOD 600値は、サンプルの代わりに水を添加した際のOD 600値(プランク)を1とした際の比(ratio)で表した。

【実施例3】

【0054】

C. 粗抽出物の調製

上記[B]記載の手法によって、0.1M NaCl溶出画分と、0.5M NaCl溶出画分に強い早凝活性が認められた(図3)。これらの画分について全量を、それぞれロータリーエバポレーターを用いて600 ml程度まで濃縮し、上記[A]と同様に超純水に対して透析を行った。透析内膜はフェノール硫酸法によって糖含量を決定した。その後、得られた試料を凍結乾燥し、糖含量が約1.7 g(0.1M NaCl溶出画分)、約0.5 g(0.5M NaCl溶出画分)の粗抽出物を得た。

【実施例4】

【0055】

D. 早凝国産麦芽からの早凝因子の精製

(1) 上記[C]の操作で得られた粗抽出物をDEAE-Sephadex A25(Amersham)クロマトグラフィーによって分画した。分画はまず粗抽出物を20 mM酢酸バッファー(pH 5.0)に溶解し、遠心分離によって水不溶物を除去した後、DEAE-Sephadex A25カラムにアプライし、同一緩衝液でカラムを洗浄した。その後、同一緩衝液に0.1M濃度のNaClを調整しカラムを洗浄した。次いで同一緩衝液に0.1Mから1.0M濃度のNaClを調整してグラディエントで溶出させた。

【0056】

その後、同一緩衝液に1.0M濃度のNaClを調整してカラムを洗浄し、続いて0.5M濃度のNaOHでカラムを洗浄した。溶出液は0.5M NaOHでの洗浄液以外は試験管に5mlずつ分取した。0.5M NaOHでの洗浄液はまとめて取得した。各溶出液についてフェノール硫酸法によって糖含量を決定し、ピーク毎にフラクションをまとめた（図4）。まとめた各フラクションは上記[A]と同様に超純水に対して透析後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、超純水に溶解した後、各フラクションについてフェノール硫酸法によって糖含量を決定した。また上記[B]記載の手法によって活性画分を同定したところ、フラクション5（Fr. 5）に活性が集中したことが確認された（図5）。

【0057】

(2) 得られた活性画分を再びD E A E - Sephadex A25(Amersham)クロマトグラフィーによって分画した。分画は上記(1)で得られた活性画分Fr. 5溶液を終濃度20mM酢酸バッファー(pH 5.0)に調整した後、D E A E - Sephadex A25カラムにアプライし、同一緩衝液でカラムを洗浄した。その後、同一緩衝液に0.2M濃度のNaClを調整し、カラムを洗浄した。次いで同一緩衝液に0.2Mから0.5M濃度のNaClを調整してグラディエントで溶出させた。その後、同一緩衝液に0.5M濃度のNaClを調整してカラムを洗浄し、続いて0.5M濃度のNaOHでカラムを洗浄した。溶出液は0.5M NaOHでの洗浄液以外は試験管に6mlずつ分取した。

【0058】

0.5M NaOHでの洗浄液はまとめて取得した。各溶出液についてフェノール硫酸法によって糖含量を、Lowry法によってタンパク濃度を決定し、糖含量のピーク毎にフラクションをまとめた（図6）。まとめた各フラクションは上記[A]と同様に超純水に対して透析後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、超純水に溶解した後、各フラクションについてフェノール硫酸法によって糖含量を決定した。各フラクションについて、糖量として $2\mu\text{g}$ を用いて上記[B]記載の手法によって活性画分を同定したところ、フラクション3（Fr. 3）とフラクション5（Fr. 5）に活性が認められた（図7）。

【0059】

(3) 上記操作によって得られた活性画分の分子量をBioGel P100サイズ排除クロマトグラフィーによって確かめた（移動相は超純水）。分子量はCarboMer社より購入したデキストラン（分子量40,000Da、分子量5,000Da）を標準多糖類とし、その溶出時間との比較により決定した。溶出液は試験管に2mlずつ分取し、各溶出液に対しフェノール硫酸法によって糖濃度を測定した。また、各溶出液について上記[B]記載の手法によって活性測定を行った。このクロマトグラフィーで活性多糖からは单一対象ピークが得られ、さらに早凝活性のピークとクロマトグラフィーのピークが一致した。得られたピークはデキストラン（分子量40,000Da）より後ろに得られた（図8）。

【0060】

(4) 上記操作によって得られた画分にはタンパク質が含まれていたため、フェノール・クロロホルム処理によって除タンパク操作を行った。処理により得られた水層についてはエタノール沈殿を行い、高分子多糖を回収した。得られた試料の糖含量をフェノール硫酸法によって決定し、糖量として $1\mu\text{g}$ を用いて上記[B]記載の手法によって活性画分を同定した。その結果、両フラクションとも活性が確認された（図9）。

【0061】

(5) 上記(4)の操作によって得られたサンプルのタンパク質含量を検定するため、フェノール・クロロホルム処理前のサンプル、及び、処理後の水層について、SDS-PAGEを行い、銀染色によって含有タンパク質を検出した。その結果、得られた水層にはタンパク質がほとんど含まれていないことが確認された（図10）。

【0062】

(6) 上記(4)の操作によって得られたFr. 3とFr. 5について糖組成の分析を行った。糖組成分析は試料を1Mトリフルオロ酢酸(TFA)中、110℃、5時間、加水分解を行った後、遠心エバポレーターにより分解物を濃縮乾固した。乾固した分解物は40

$0 \mu\text{l}$ の超純水に溶解後、Ultrafree-MC 0.45 μm

Filter Unit(Millipore)により、微粒子を除去しDionex社製 糖分析用HPLC (DX-500 ; HPAE-PAD法) を用いて分析を行った。糖組成分析の結果、Fr. 3とFr. 5はアラビノース(Ara)、ガラクトース(Gal)、キシロース(Xyl)を主成分としていることが判明した。また、Fr. 3とFr. 5はほとんど一致した組成をしていた(表1)。

【0063】

【表1】

フェノールクロロホルム処理で得られた Fr.3とFr.5水層の糖組成(モル%)

| | Fuc | Ara | Rha | Gal | Glc | Xyl | Man | GaIA | GlcA |
|----------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|------|
| Fr. 3 水層 | 0.1 | 22.1 | 2.2 | 32.6 | 5.8 | 24.2 | 9.2 | 2.3 | 1.5 |
| Fr. 5 水層 | 0.2 | 20.3 | 5.6 | 32.1 | 5.2 | 23.5 | 6.7 | 4.8 | 1.6 |

【0064】

(7) (6) の結果から、上記の操作によって得られたFr. 3とFr. 5が複数の多糖種の混合物だと仮定した場合、混合比がまったく同程度に2つのフラクションに分画されるとは考えにくい。よって、Fr. 3とFr. 5極性が微妙に異なる同一種の多糖であり、早凝国産麦芽由来の早凝因子は多糖種としてはほぼ完全に精製されたことが示され、(3)～(5)の結果から、早凝国産麦芽由来の早凝因子はタンパク成分を含まない平均分子量40,000弱の多糖類であることが判明した。また本手法により得られた早凝因子は、上記[B]記載の手法によって、糖濃度300ng/mlで強い早凝活性を示す物質であることが確認された。以下、早凝国産麦芽から本手法で得られた早凝因子を「早凝因子D」と記す。

【実施例5】

【0065】

E. 早凝因子DのConAを用いた分画

(1) 上記[D]の操作によって得られた早凝因子Dをレクチンアフィニティークロマトグラフィーによって、より微細な構造の違いによって分画することを試みた。分画には生化学工業社から購入したコンカナバリンA-アガロース(ConA-Agarose)を用いた。上記[D]の操作により得られた早凝因子D 800 μg を1×PBS(−)(Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines(−))に溶解した後、ConA-Agaroseカラムにアプライし、同一緩衝液でカラムを洗浄して得られた画分を素通り画分とした(FT画分)。その後、同一緩衝液に5 mM濃度の α -メチル-D-グルコシド(aMdGlc)を調整しカラムを洗浄し得られた画分を5 mM G1c画分とした。一連の操作を同一緩衝液に20 mM濃度のaMdGlc、300 mM濃度の α -メチル-D-マンノシド(aMdMan)、0.5 M濃度のNaClを調整して順次行い、得られた画分をそれぞれ、20 mM G1c画分、300 mM Man画分、0.5 M NaCl画分とした。

【0066】

(2) 上記(1)の操作によって得られたそれぞれの画分から、限外ろ過膜ユニットCentricon YM-10(Amicon)を用いて高分子画分を回収した。得られた各画分の液量の1/800(カラムに供したサンプルの糖量1ugに相当する液量)を用いて、上記[B]記載の手法によって活性測定を行った。その結果、5 mM G1c画分にのみ活性が認められた(図11)。

【0067】

(3) 上記(2)の操作によって得られた各画分の高分子画分をSlide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit MWCO 3.5 K(PIERCE)を用いて超純水に対して透析を行った。得られた透

析内液を上記[D]に示した手法に従って糖組成分析を実施し、得られた各構成单糖の質量を合算して、各画分の糖含量を算出した（表2）。

【0068】

【表2】

早凝因子D ConA分画物の糖含量

| | FT | 5mM Glc | 20mM Glc | 300mM Man | 0.5M NaCl |
|-----------|--------|---------|----------|-----------|-----------|
| total(ug) | 516.49 | 100.76 | 38.66 | 68.35 | 30.61 |
| % | 68.4 | 13.3 | 5.1 | 9.1 | 4.1 |

【0069】

その結果、上記(2)で活性が集中した5mM Glc画分は全体の約13%の糖含量しか認められず、分画に供した試料の大部分(約70%)はFT画分に分画されたことが明らかとなつた。糖組成の結果からは、活性を持たないFT画分と活性を持つ5mM Glc画分の糖組成はかなりの部分で類似しており、非常に類似した構造をもつ多糖種の中の微細な構造が早凝活性を決定づけていることが示された(表3)。

【0070】

【表3】

早凝因子D ConA分画物の糖組成

| mol% | FT | 5mM Glc | 20mM Glc | 300mM Man | 0.5M NaCl |
|------|------|---------|----------|-----------|-----------|
| Fuc | 0.4 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Ara | 29.5 | 34.0 | 1.0 | 0.3 | 0.0 |
| Rha | 8.5 | 10.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Gal | 21.1 | 12.9 | 1.6 | 0.5 | 0.6 |
| Glc | 3.2 | 10.0 | 76.0 | 3.9 | 10.8 |
| Xyl | 21.6 | 20.7 | 19.1 | 24.2 | 80.3 |
| Man | 2.6 | 3.0 | 2.3 | 71.1 | 8.3 |
| | | | | | |
| GalA | 10.0 | 6.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| GlcA | 3.0 | 2.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

【0071】

(4) 本手法によって、上記[D]によって精製された早凝因子D中には早凝活性を持たない種類の多糖種と、早凝活性本体を担う多糖種が混在することが示された。また、それらの糖組成の分析結果からは、それらの多糖類はかなりの点で類似していることが示唆された。本手法で得られた5mM Glc画分は、上記[B]記載の手法によって、糖濃度50ng/m1で強い早凝活性を示すことが確認された。

【実施例6】

【0072】

F. 早凝因子Dのメチル化分析

(1) 上記[E]の操作で得られた、早凝因子D ConA FT画分、ConA 5mM Glc画分の構成单糖の結合位置を調べる目的で、得られた多糖のメチル化分析を実施した。メチル化分析とは多糖を構成している单糖の結合位置を決定する手法であり、詳細は成書に記載されている(例えば生物化学実験法23 糖タンパク質糖鎖研究法 学会出版センター)。成書記載の手法に従って、ConA FT画分、ConA 5mM Glc画分の遊離水酸基を完全にメチル化した後、メチル化多糖を单糖まで加水分解し、還元、アセチル化することにより、各々の試料より部分メチル化アルジトールアセテート誘導体を得、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフ質量分析計で分析した。

【0073】

(2) 上記(1)記載の手法で分析した結果、早凝因子D ConA FT画分、ConA 5mM Glc画分は非常に類似した分析結果が得られ、両画分は非常に類似した構造体であることが示さ

れた。また各々の画分には、少なくとも($\rightarrow 4\text{ X y l l } \rightarrow$)連結のキシロース単位、($\rightarrow 5\text{ A r a l } \rightarrow$)連結のアラビノース単位、($\rightarrow 3\text{ G a l l } \rightarrow$)連結のガラクトース単位、($\rightarrow 6\text{ G a l l } \rightarrow$)連結のガラクトース単位、($\rightarrow 3, 6\text{ G a l l } \rightarrow$)連結のガラクトース単位、($\rightarrow 2\text{ R h a l } \rightarrow$)連結のラムノース単位、($\rightarrow 2, 4\text{ R h a l } \rightarrow$)連結のラムノース単位、非還元末端のアラビノース単位、キシロース単位、ガラクトース単位、グルコース単位、マンノース単位が含まれていること確認された。また、5 mM G 1 c 画分は F T 画分と比較して($\rightarrow 3, 6\text{ G a l l } \rightarrow$)連結のガラクトース単位、非還元末端グルコース単位、マンノース単位が多く含まれ、非還元末端アラビノース単位、ガラクトース単位が少ないことが判明した。

【実施例 7】

【0074】

G. 早凝因子Dの断片化

(1) Sanzyme 1000 (三共株式会社; J.Biochem. 97, 801-810 (1985) 参照) 1 g を 15 ml の 20 mM 酢酸バッファー ($\text{pH} = 5.0$) に溶解後、遠心分離によって水不溶性沈殿と上清に分離した。得られた上清に硫酸アンモニウム 7.5 g を添加しタンパク質の沈殿を形成した。4 °Cで一晩放置後、遠心分離によって沈殿を回収し、得られた沈殿を再び 15 ml の 20 mM 酢酸バッファー ($\text{pH} = 5.0$) に溶解した。得られた溶液を上記と同様の操作によって沈殿を形成し回収した。沈殿を再び 20 mM 酢酸バッファー ($\text{pH} = 5.0$) 15 ml に溶解した後、透析膜 (Spectra/Por 1 MWCO 6,000-8,000 (フナコシ)) を用いて 20 mM 酢酸バッファー ($\text{pH} = 5.0$) に対して透析した。得られた透析内液を遠心分離によって水不溶性沈殿と上清に分離し、上清を Sanzyme 1000 粗精製溶液とした。得られた溶液は -20 °C で凍結保存した。

【0075】

(2) 上記 [D] の操作によって精製した早凝因子Dを 20 mM 酢酸バッファー ($\text{pH} = 5.0$) に溶解した後、上記 (1) の操作により得られた Sanzyme 1000 粗精製溶液を添加し、40 °Cで一晩反応させた。得られた反応液は 100 °Cで 10 分間加熱処理を行い、酵素を失活させた。上記の操作によって得られた反応液を遠心分離によって沈殿と上清に分離し、上清を早凝因子Dの Sanzyme 1000 処理液とした。

【0076】

(3) 上記 (2) の操作により得られた Sanzyme 1000 処理液中の早凝因子Dの分解度合いを確認するために、Sanzyme 1000 処理液を BioGel P 2 (BIORAD) サイズ排除クロマトグラフィーによって分画した (移動相は超純水)。溶出液は試験管に 2 ml ずつ分取し、各溶出液に対しフェノール硫酸法によって糖濃度を測定した。その結果、高分子画分に全糖量の 51%、低分子画分に全糖量の 49% が分画された (図 12)。各溶出液について上記 [B] 記載の手法によって活性測定を行ったところ、高分子画分のみに強い早凝活性が認められた (図 13)。

【0077】

(4) Sanzyme 1000 処理液を DEAE-Sephadex A25 (Amersham) クロマトグラフィーによって分画した。Sanzyme 1000 処理液を終濃度 20 mM 酢酸バッファー ($\text{pH} = 5.0$) に調整した後、DEAE-Sephadex A25 カラムにアプライし、同一緩衝液でカラムを洗浄し、得られた画分を素通り画分 (F T 画分) とした。その後、同一緩衝液に 0.1 M 濃度の NaCl を調整し、カラムを洗浄して得られた画分を 0.1 M 画分とした。一連の操作を同一緩衝液に 0.6 M、1.0 M 濃度の NaCl を調整して順次実施し、得られた画分をそれぞれ 0.6 M 画分、1.0 M 画分とした。得られたそれぞれの画分から限外ろ過膜ユニット Microcon YM-3 (Amicon) を用いて高分子画分を回収した。得られたそれぞれの画分の高分子画分についてフェノール硫酸法によって糖含量を決定したところ、糖の大部分は素通り画分と 0.6 M 画分にほぼ 50% ずつ分画されたことが判明した (表 4)。また、得られた各画分の活性を上記 [B] 記載の手法によって測定したところ、強い早凝活性は 0.6 M 画分に集中することが判明した (図 14)。

【0078】

【表4】

早凝因子D Sanzyme1000処理物のDEAE分画物の糖含量

| | 素通り | 0.1M | 0.6M | 1.0M | NaOH |
|------------|------|------|------|------|------|
| total (mg) | 2.64 | ND | 2.67 | ND | ND |
| % | 49.7 | | 50.3 | | |

(ND: Not detected)

【0079】

(5) 次いで、Sanzyme 1000処理液中の活性本体の分子量を検討した。上記[D]で得られた除タンパク前の早凝因子Dを上記(2)の操作と同様にSanzyme 1000酵素液で処理し、BioGel P10(BIORAD)サイズ排除クロマトグラフィーを実施した(移動相は超純水)。分子量はCarboMer社より購入したデキストラン(分子量40,000Da、分子量5,000Da)を標準多糖類とし、その溶出時間との比較により決定した。溶出液は試験管に2mLずつ分取し、各溶出液に対しフェノール硫酸法によって糖濃度を測定した。その結果、高分子領域にはブロードな糖の溶出が認められ、低分子領域に大きな糖のピークが認められた。各溶出液の活性を上記[B]記載の手法によって測定したところ、強い早凝活性は低分子領域の大きな糖のピークの手前に集中することが判明した。標準多糖類の溶出パターンとの比較から、Sanzyme 1000処理液中の活性本体の分子量は5,000弱であることが判明した(図15)。

【0080】

(6) 上記(1)～(5)より、[D]の操作で得られた早凝因子Dを、早凝活性を保持したまま酵素的に分断することにより低分子化し、その低分子化した早凝因子D断片物を回収できることが判明した。また、上記(4)の操作により得られた低分子化した早凝因子D断片物は、上記[B]記載の手法によって、糖濃度100ng/mLで強い早凝活性を示す物質であることが確認された。

【実施例8】

【0081】

H. Sanzyme処理物 0.6M画分のConA分画

(1) 上記[G]の操作によって得られた0.6M画分をアフィニティークロマトグラフィーによって、より微細な構造の違いによって分画することを試みた。分画は上記[G]の操作により得られた0.6M画分400μgを[E]と同様にConA-Agaroseカラムで分画し、FT画分、5mM G1c画分、20mM G1c画分、300mM Man画分、0.5M NaC1画分を得た。

【0082】

(2) 上記(1)の操作によって得られたそれぞれの画分から限外ろ過膜ユニットMicrocon YM-3(Amicon)を用いて高分子画分を回収し、得られた各画分の液量の1/400量(カラムに供したサンプルの糖量1μgに相当する液量)を用いて、上記[B]記載の手法によって活性測定を行った。その結果、5mM G1c画分にのみ強い早凝活性が認められた(図16)。

【0083】

(3) 上記(2)の操作によって得られた各画分の高分子画分をSlide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit MWC0 3.5K(PIERCE)を用いて超純水に対して透析を行った。得られた透析内液を[D]に示した手法に従って糖組成分析を実施し、得られた各構成单糖の質量を合算して、各画分の糖含量を算出した。その結果、上記(2)で強い早凝活性が集中した5mM G1c画分は全体の約8%の糖含量しか認められず、分画に供した試料の大部分(約70%)はFT画分に分画されたことが明らかとなった(表5)。糖組成の結果からはアラビノース(Ara)、ガラクトース(Gal)、グルコース(Glc)をそれぞれ約10%含み、Xylを約4.6%含む、現在までに報告のない特殊な多糖であることが示された(表6)。

【0084】

【表5】

Sanzyme1000処理物のDEAE分画0.6M画分のConA分画物糖含量

| | 素通り | 5mM Glc | 20mM Glc | 300mM Man | 0.5M NaCl |
|-------|--------|---------|----------|-----------|-----------|
| total | 233.53 | 27.37 | 10.95 | 35.05 | 20.89 |
| % | 71.2 | 8.3 | 3.3 | 10.7 | 6.4 |

【0085】

【表6】

Sanzyme1000処理物のDEAE分画0.6M画分のConA分画物糖組成

| mol% | 素通り | 5mM Glc | 20mM Glc | 300mM Man | 0.5M NaCl |
|------|------|---------|----------|-----------|-----------|
| Fuc | 0.6 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Ara | 19.3 | 12.3 | 0.0 | 0.0 | 0.7 |
| Rha | 13.5 | 4.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Gal | 28.0 | 10.4 | 1.6 | 0.5 | 0.5 |
| Glc | 3.7 | 11.6 | 25.8 | 4.0 | 2.0 |
| Xyl | 12.6 | 46.5 | 67.4 | 25.3 | 46.6 |
| Man | 2.9 | 8.0 | 2.4 | 70.2 | 50.2 |
| | | | | | |
| GalA | 15.0 | 2.4 | 2.2 | 0.0 | 0.0 |
| GlcA | 4.4 | 3.6 | 0.6 | 0.0 | 0.0 |

【0086】

(4) 以上、(1)～(3)の結果から、[D]に示した早凝因子Dを酵素剤を用いて断片化し、さらにその活性に重要なコア構造体を取得できることが示された。また、本手法で得られた画分は、上記[B]記載の手法によって、糖濃度20ng/mlで強い早凝活性を示す物質であることが確認された。

【実施例9】

【0087】

I. 海外産大麦早凝麦芽由来の早凝因子の精製

(1) 上記、[A]～[H]で記載した早凝因子Dについては、全て同一の麦芽ロットである早凝国産麦芽から得られた知見であったため、品種・産地・麦芽製造業者の異なる麦芽から早凝因子を精製して、上記[A]～[H]で示した性質と同様の性質を有するかどうか検討を行った。

【0088】

(2) 上記[A]と同様に、早凝麦芽と判定された海外産大麦品種から得られた早凝麦芽（以下、海外産早凝麦芽と記す）を用いて、上記[A]～[D]記載の手法に従って、早凝活性を有する多糖類を精製した（以下、本多糖類を「早凝因子F」と記す）。上記、「D」の手法に従って得られた早凝因子Fの糖組成を（表7）に、サイズ排除クロマトグラフィーの結果を（図17）に示した。その結果、早凝因子Fの糖組成は早凝コントロール因子とその組成が若干異なりアラビノース含量が高く、ガラクトース、キシロース含量が低いが、早凝コントロール因子と同様にアラビノース、ガラクトース、キシロースを主要構成糖とする多糖類であった。また、BioGelP-100(BIORAD)サイズ排除クロマトグラフィーによる平均分子量は80,000程度であることが判明した。また、上記サイズ排除クロマトグラフィーによって得られた画分の活性を上記[B]記載の手法によって測定したところ、活性のピークとクロマトグラフのピークが一致した（図18）。さらに、本手法によって得られた早凝因子Fは、上記[B]記載の手法によって、糖濃度600ng/mlで強い早凝活性を示す多糖類であることが判明した。

【0089】

【表7】

早凝因子Fの糖組成(モル%)

| Fuc | Ara | Rha | Gal | Glc | Xyl | Man | GaIA | GlcA |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|------|
| 0.3 | 51.5 | 7.4 | 16.5 | 3.0 | 11.4 | 2.3 | 5.4 | 2.2 |

【0090】

(3) 早凝因子FをConAで分画したときの挙動が、早凝因子Dと一致するかどうか検討した。上記【E】記載と同様の手法で、早凝因子FをConA-Agaroseカラムで分画し、FT画分、5 mM G1c画分、50 mM G1c画分、300 mM Man画分、0.5 M NaC1画分を得た。次いで得られたそれぞれの画分から、限外ろ過膜ユニットMicrocon YM-10 (Amicon)を用いて高分子画分を回収した。得られた各画分の活性を上記「B」記載の手法によって測定したところ、早凝因子Dと同じく、5 mM G1c画分に強い早凝活性が集中したことが認められた(図19)。

【0091】

(4) 早凝因子Fを、Sanzyme 1000を用いて酵素分解することによって得られる断片が、【D】に記載した早凝因子D断片と同じ性質を持つかどうか検討した。上記(1)記載の早凝因子Fを上記【G】記載の手法で分解後、DEAE-Sephadex A25カラムにより分画し、FT画分、0.1 M NaC1画分、0.6 M NaC1画分、1.0 M NaC1画分、0.5 M NaOH画分を得た。次いで得られたそれぞれの画分から、限外ろ過膜ユニットMicrocon YM-3 (Amicon)を用いて高分子画分を回収した。得られた各画分の早凝活性を上記【B】記載の手法によって測定したところ、0.6 M NaC1画分にのみ強い早凝活性が認められた(図20)。

【0092】

(5) 上記(4)記載の手法により得られた早凝因子FSanzyme 1000分解物のDEAE 0.6 M NaC1画分が、上記【H】記載した早凝因子Dの場合と同じ性質を持つかどうか検討した。上記(4)記載の早凝因子FSanzyme 1000分解物のDEAE 0.6 M NaC1画分を上記【H】記載と同様の手法で、ConA-Agaroseカラムで分画し、FT画分、5 mM G1c画分、50 mM G1c画分、300 mM Man画分、0.5 M NaC1画分を得た。次いで得られたそれぞれの画分から、限外ろ過膜ユニットMicrocon YM-3 (Amicon)を用いて高分子画分を回収した。得られた各画分の活性を上記【B】記載の手法に従って測定したところ、早凝因子Dの場合と同じく、5 mM G1c画分に活性が集中したことが認められた(図21)。

【0093】

(6) 上記(1)～(5)の検討によって、早凝国産麦芽と品種・産地・製麦業者が異なる早凝麦芽である海外産早凝麦芽から精製した早凝因子Fは、早凝因子Dと全く同様の諸性質を有することが明らかとなった。以上の検討から、早凝因子Fは早凝因子Dに比して、その主鎖あるいは側鎖の大きさが異なる多糖類であるが、早凝活性に重要なコア構造体について共通していることが推察された。

【0094】

(7) 以上【A】～【I】の検討によって、早凝因子なる多糖類物質は大麦の品種・産地・製麦業者の違いに依らず、その活性を示すための重要な構造体が共通である一連の多糖類物質と結論付けられた。

【実施例10】

【0095】

J. 早凝因子Dに対する抗体の作成

上記【D】の手法によって得られた早凝因子Dを抗原とするモノクローナル抗体を作成した。以下に作成法の一例について詳述しておく。

【0096】

(1) <動物への免疫>

上記[D]の手法によって得られた早凝因子Dを図22に示したスケジュールに従って6週齢のマウス(Balb/c系、雌)4個体に対して投与した。

【0097】

(2) <抗血清の評価>

免疫6回目の7日後に、マウスの尾部を剃刀で切り0.2mlの血液を採取した。採血したtubeから凝固した血餅を剥がし、2500rpmで5分間遠心して抗血清を採取した。各採血後、以下に示す標準ELISA(固相酵素免疫検定法)によって早凝因子Dに対する抗体価を評価した。

【0098】

(3) <抗体価の評価>

上記「D」の手法によって得られた早凝因子Dを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように0.1M炭酸緩衝液($\text{pH}=9.5$)に調整し、96穴ELISAプレートに $50\mu\text{l}$ ずつ分注後4°Cで一晩放置して固相化した。次いで、希釈/ブロッキング用溶液(0.1%BSA、0.05%NaN₃、PBS(-))を各ウェルに添加し、4°Cで一晩放置してブロッキングした。その後、各ウェルを洗浄用緩衝液(0.05%Tween-20、PBS(-))で洗浄し、上記(2)で得られた抗血清を希釈/ブロッキング用溶液で100倍、200倍、400倍、800倍、1600倍、3200倍、6400倍に段階的に希釈し、それぞれの溶液 $50\mu\text{l}$ を各ウェルに添加し37°Cで1時間放置した。各ウェルを洗浄用緩衝液で洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗イムノグロブリンを添加し、37°Cで1時間放置した。各ウェルを洗浄用緩衝液で洗浄後、常法に従って過酸化水素水-O PD(o-Phenylenediamine)で発色させ、1N硫酸を加えてからプレートリーダーで490nmの吸光度を測定した。以上の操作により、見かけの抗体価が最も高かった個体No.3(図23)を用いて以下の操作によりハイブリドーマを作成した。

【0099】

(4) <細胞融合>

上記(3)で得た個体No.3のマウスから脾臓細胞を摘出し、マウスSpleen Cell($1.53 \times 10^8 \text{ cells/total}$)とX-63·Ag8 Cell($1.53 \times 10^7 \text{ cells/total}$)をポリエチレンギリコール溶液にて細胞融合した。得られたハイブリドーマを、10%FBSを添加したTIL Media I(免疫生物研究所)を用いて、96well Plate 7枚に播種した。その翌日より、培地を10%FBSを添加したHAT Media(免疫生物研究所)に置換し、スクリーニングまで10日間培養した。

【0100】

(5) <ハイブリドーマのスクリーニング>

上記(4)の操作によって得られた各ウェルの培養上清を用いて、上記(3)と同様の手法により標準ELISAを実施し、早凝因子Dに特異的に反応するウェルを選択した。

【0101】

(6) <ハイブリドーマのクローニング>

選抜されたクローンを限界希釈法によりクローニングした。得られた各クローンに対して上記(3)と同様の手法により標準ELISAを実施し、早凝コントロール因子に特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得た。この実施例で取得されたハイブリドーマは、PFHK-1と命名した。該ハイブリドーマは、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにプダペスト条約に基く国際寄託として寄託され、受託番号FERM BP-08602が付与された。

【実施例11】

【0102】

K. 得られたモノクローナル抗体の評価

上記[J]の手法により得られたモノクローナル抗体の特異性を評価した。

(1) <早凝因子Dに対する特異性の評価>

モノクローナル抗体を作成するにあたって、抗原として使用した多糖類は上記[D]で得

られた早凝因子Dであったため、より精製度の高い上記【E】で得られた5 mM G1c画分(sample 1)、及び、上記【H】で得られた早凝因子Dを酵素剤で断片化し、さらにその活性に重要なコア構造体を抽出した5 mM G1c画分(sample 2)と反応するか否かを、上記「J」に示した標準ELISAで検討した。その結果、得られたモノクローナル抗体は両サンプルとともに反応し、プロッキング剤に用いたBSAとは反応しないことが示された(図24)。

【0103】

(2) <市販の多糖に対する特異性の評価>

市販されている各種多糖と得られたモノクローナル抗体との反応性を評価した。各試薬メーカーから販売されている多糖のうち、デンプン、デキストリン、フルラン、グリコーゲン、デキストラン、アラビアゴム、ポリガラクトュロン酸(ポリGal A)、ペクチン、N-アセチルキトヘキサオース(G1cNAc5)、キシランを用いて、上記【J】に示した標準ELISAで検討した。その結果、得られたモノクローナル抗体は検討に使用した多糖の中で、精製した早凝因子Dに最も強く反応することが示された(図25)。また、得られたモノクローナル抗体はキシラン、ペクチン、アラビアゴムと弱く反応することが示された。精製した早凝コントロール因子は、その構造中に、少なくとも($\rightarrow 4\text{ X y 1 1} \rightarrow$)連結のキシロース単位、($\rightarrow 5\text{ A r a 1} \rightarrow$)連結のアラビノース単位、($\rightarrow 3\text{ G a 1 1} \rightarrow$)連結のガラクトース単位、($\rightarrow 6\text{ G a 1 1} \rightarrow$)連結のガラクトース単位、($\rightarrow 3, 6\text{ G a 1 1} \rightarrow$)連結のガラクトース単位、($\rightarrow 2\text{ R h a 1} \rightarrow$)連結のラムノース単位、($\rightarrow 2, 4\text{ R h a 1} \rightarrow$)連結のラムノース単位が含まれることから、得られたモノクローナル抗体がこれら3種の市販多糖と弱い反応性を示すことは特に不思議ではない。

【0104】

(3) <早凝因子Fに対する特異性の評価>

上記【I】の操作によって得られた早凝因子Fと、得られたモノクローナル抗体との反応性を評価した。実施例【I】記載の早凝因子F(sample 1)、実施例【I】-(3)記載の5 mM G1c画分(sample 2)、実施例【I】-(4)記載の0.6 M NaCl画分を用いて、上記【J】に示した標準ELISAで検討した。その結果、得られたモノクローナル抗体はいずれのサンプルに対しても強く反応することが示された(図26)。この結果から、早凝因子Dと早凝因子Fは同じ構造体を有する一連の多糖物質であることが免疫化学的にも明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】本発明において、非早凝麦汁及び早凝麦汁発酵における回収酵母の顕微鏡写真を示す図である。

【図2】本発明において、早凝因子の精製スキームを示す図である。

【図3】本発明の実施例において、回収酵母から溶出した各画分の活性を測定した結果を示す図である。

【図4】本発明の実施例において、早凝麦汁粗抽出物のDEAE-Sephadex A25による分画結果を示す図である。

【図5】本発明の実施例において、早凝麦汁粗抽出物のDEAE-Sephadex A25による分画によって得られた各フラクションの活性の測定結果を示す図である。

【図6】本発明の実施例において、早凝麦汁粗抽出物のDEAE-Sephadex A25による分画によって得られたFr. 5のDEAE-Sephadex A25によるリクロマトの結果を示す図である。

【図7】本発明の実施例において、早凝麦汁粗抽出物のDEAE-Sephadex A25による分画によって得られたFr. 5のDEAE-Sephadex A25によるリクロマトによって得られた各フラクションの活性の測定結果を示す図である。

【図8】本発明の実施例において、早凝麦汁粗抽出物のDEAE-Sephadex

A25による分画によって得られたFr. 5のDEAE-Sephadex A25によるリクロマトによって得られた活性画分のBioGel P100サイズ排除クロマトグラフィーで得られた各フラクションの活性測定結果を示す図である。

【図9】本発明の実施例において、DEAE-Sephadex A25によるリクロマトによって得られた活性画分について、除タンパク質のためのフェノールクロロホルム処理前後のFr. 3及びFr. 5の活性を測定した結果を示す図である。

【図10】本発明の実施例において、DEAE-Sephadex A25によるリクロマトによって得られた活性画分について、除タンパク質のためのフェノールクロロホルム処理前後のFr. 3及びFr. 5のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

【図11】本発明の実施例において、早凝麦汁粗抽出物のDEAE-Sephadex A25による精製によって得られた活性画分をコンカナバリンAーアガロースを用いて分画した分画物の活性を測定した結果を示す図である。

【図12】本発明の実施例において、早凝因子DのSanzyme 1000処理物のBioGel P2サイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す図である。

【図13】本発明の実施例において、早凝因子DのSanzyme 1000処理物のBioGel P2サイズ排除クロマトグラフィーによって得られた各画分の活性測定結果を示す図である。

【図14】本発明の実施例において、早凝因子DのSanzyme 1000処理物のDEAE分画物の活性の測定結果を示す図である。

【図15】本発明の実施例において、早凝因子DのSanzyme 1000処理物のBioGel P10サイズ排除クロマトグラフィーと得られた各フラクションの活性の測定結果を示す図である。

【図16】本発明の実施例において、早凝因子DのSanzyme 1000処理物のDEAE分画0.6M画分のConA分画物の活性の測定結果を示す図である。

【図17】本発明の実施例において、早凝因子FのBioGel P100サイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す図である。

【図18】本発明の実施例において、早凝因子FのBioGel P100サイズ排除クロマトグラフィーにより得られた画分の活性の測定結果を示す図である。

【図19】本発明の実施例において、早凝因子FのConAカラム分画物の活性の測定結果を示す図である。

【図20】本発明の実施例において、早凝因子FのSanzyme 1000処理物のDEAE分画物の活性の測定結果を示す図である。

【図21】本発明の実施例において、早凝因子FのSanzyme 1000分解物のDEAE 0.6M NaCl画分のConA分画物の活性の測定結果を示す図である。

【図22】本発明の実施例において、早凝因子に対する抗体を作成のためのマウス免疫スケジュールを示す図である。

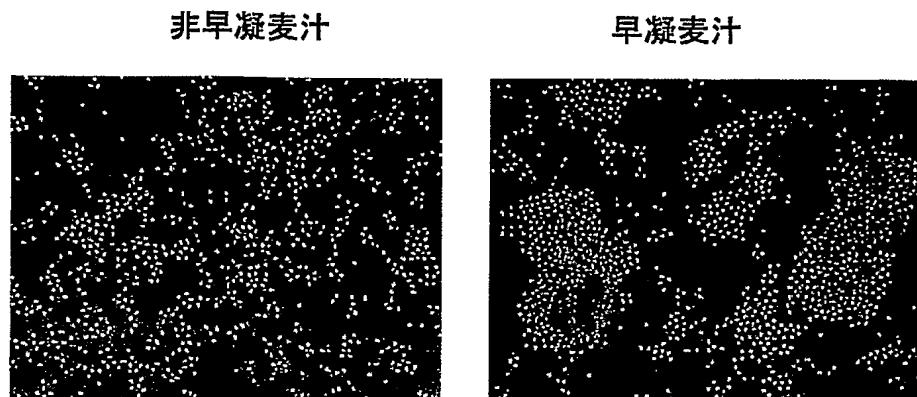
【図23】本発明の実施例において、本発明の早凝因子である精製多糖類で免疫したマウス抗血清のELISAの評価結果を示す図である。

【図24】本発明の実施例において、本発明の抗体の最終精製品のELISAの評価結果を示す図である。

【図25】本発明の実施例において、本発明で得られたモノクローナル抗体と市販の多糖との反応性について試験した結果を示す図である。

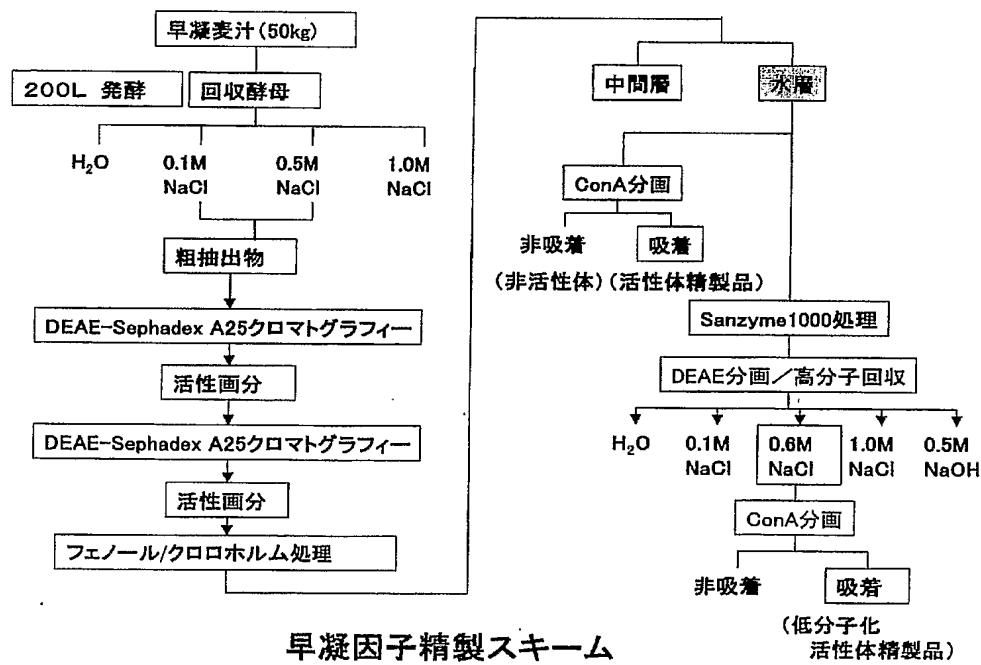
【図26】本発明の実施例において、本発明で得られたモノクローナル抗体と早凝因子Fとの反応性について試験した結果を示す図である。

【書類名】図面
【図 1】

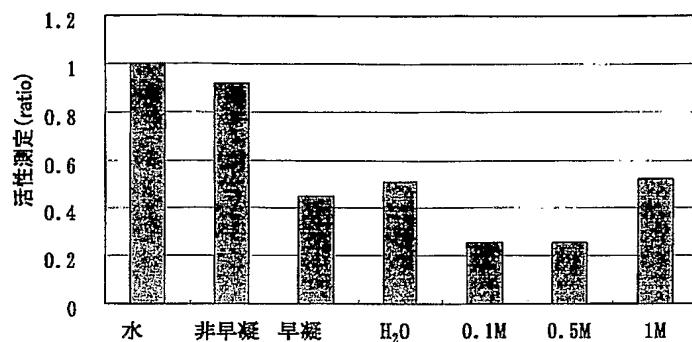


非早凝麦汁、及び、早凝麦汁発酵における回収酵母

【図 2】

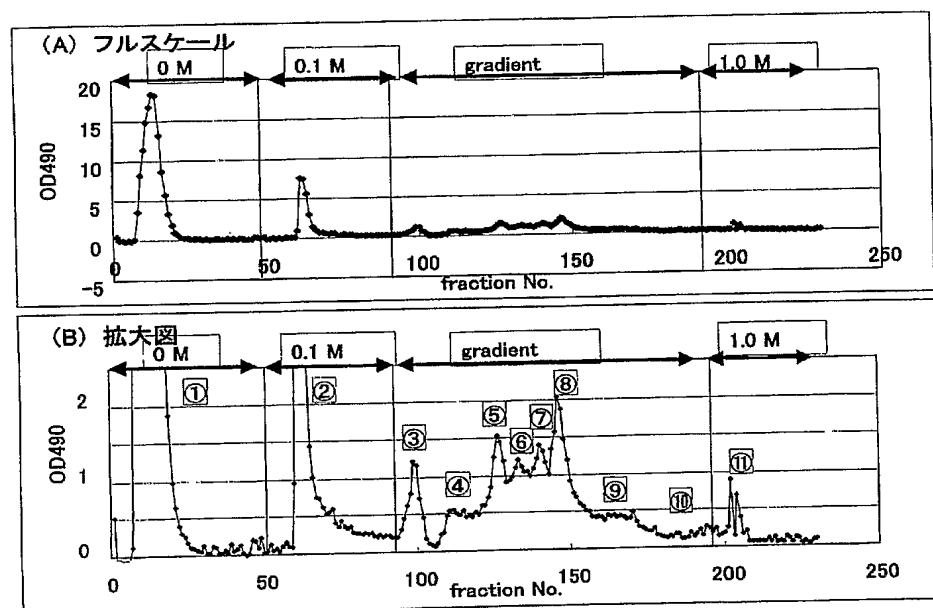


【図3】



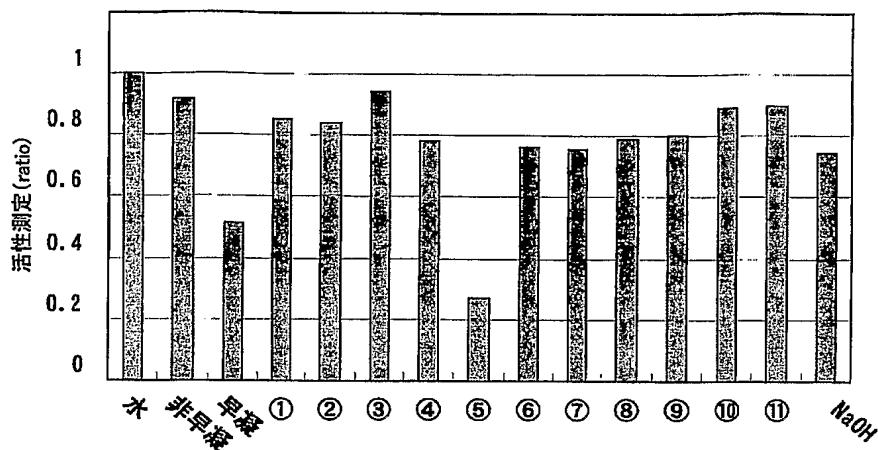
回収酵母から溶出した各画分の活性測定結果

【図4】



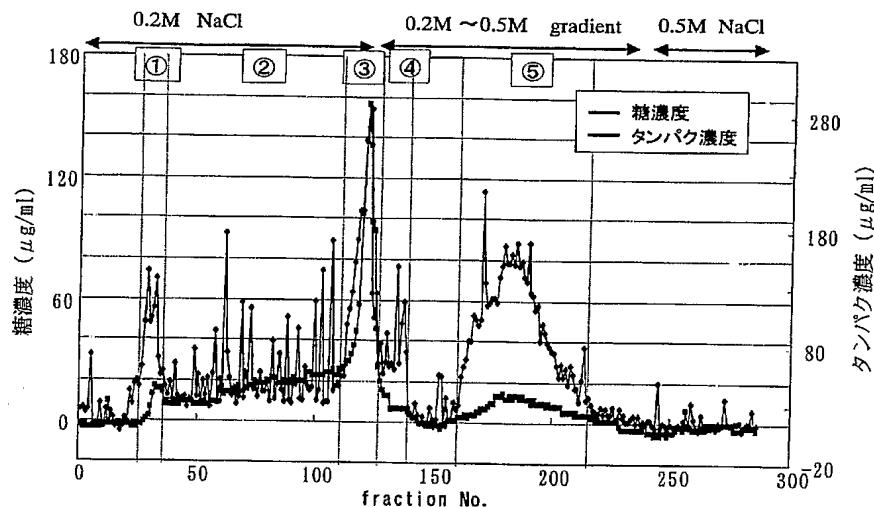
粗抽出物のDEAE-Sephadex A25による分画

【図5】



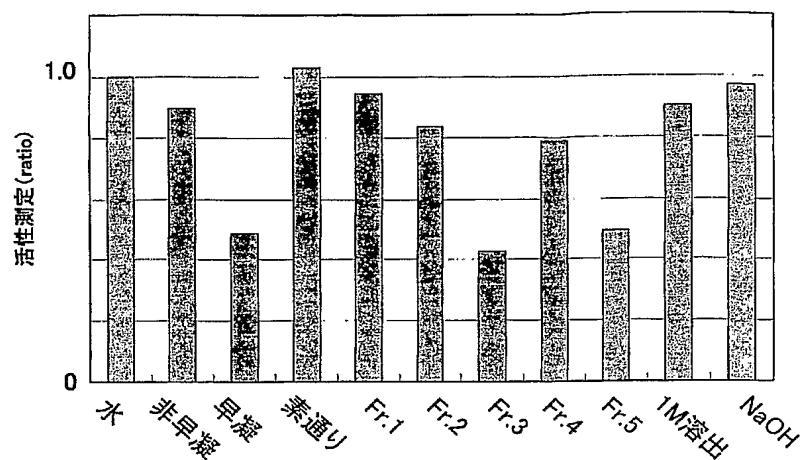
粗抽出物のDEAE-Sephadex A25分画によって得られた各フラクションの活性測定結果

【図6】



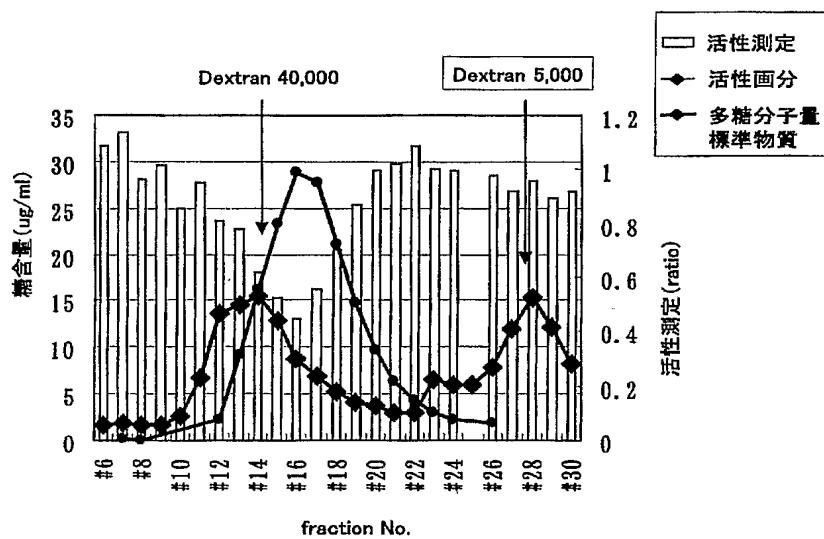
Fr.5のDEAE-Sephadex A25によるリクロマト

【図7】



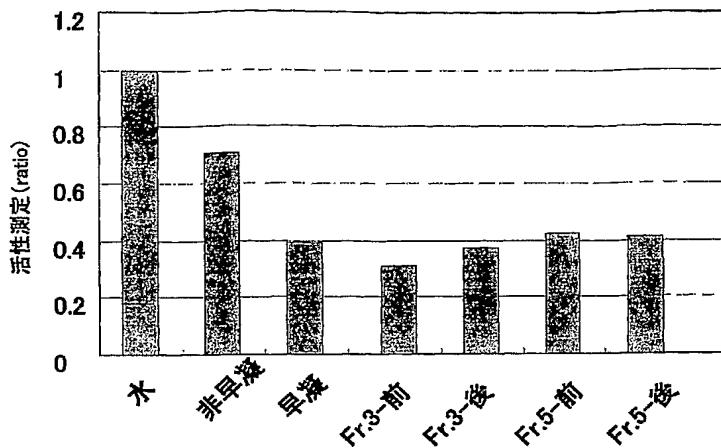
Fr.5のDEAE-Sephadex A25によるリクロマトによって得られた各フラクションの活性測定結果

【図8】



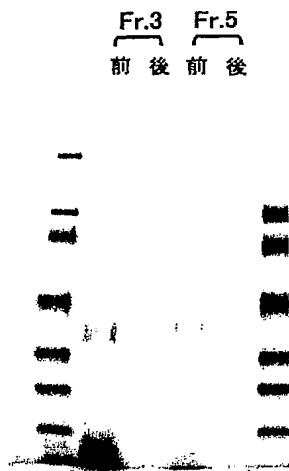
活性画分のBioGel P100サイズ排除クロマトグラフィーと得られた各フラクションの活性測定結果

【図9】

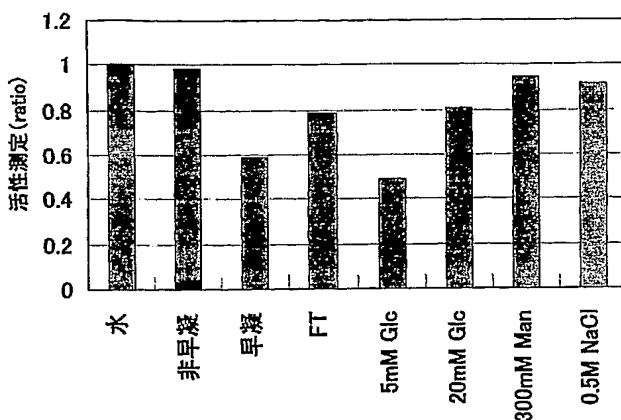


フェノールクロロホルム処理前後のFr.3、Fr.5の活性測定結果

【図10】

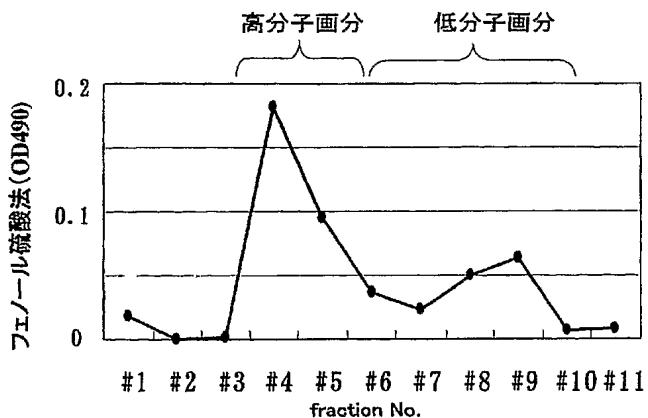
フェノールクロロホルム処理前後のFr.3、Fr.5の
SDS-PAGE結果

【図11】

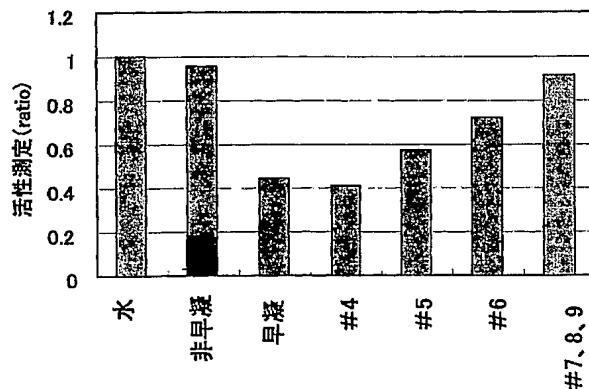


早凝因子D ConA分画物の活性測定結果

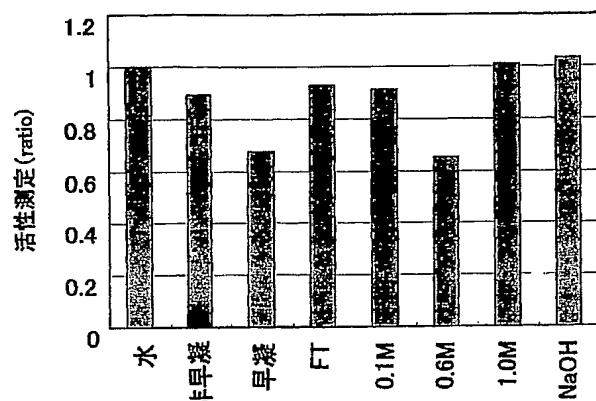
【図12】

早凝因子DのSanzyme1000処理物の
BioGel P2サイズ排除クロマトグラフィー

【図13】

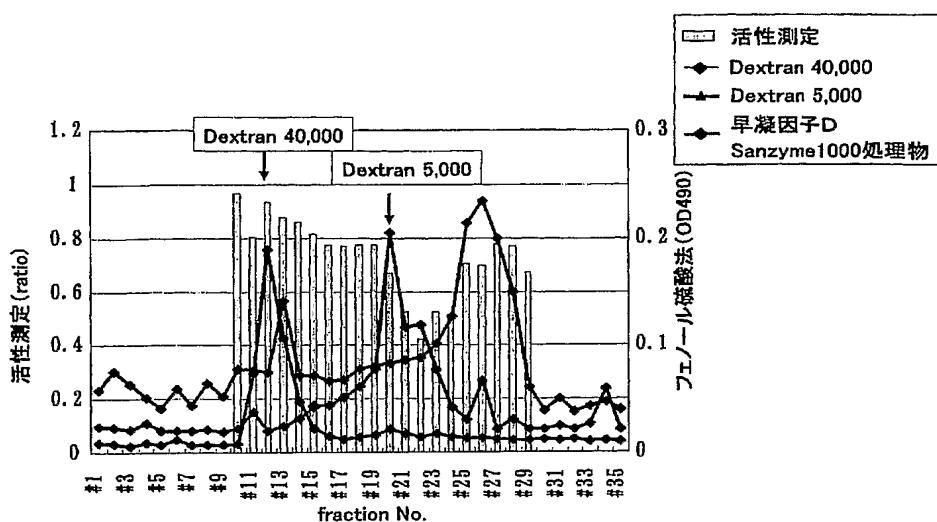
早凝因子D Sanzyme1000処理物のBioGel P2
サイズ排除クロマトグラフィーによって得られた各画分の
活性測定結果

【図14】

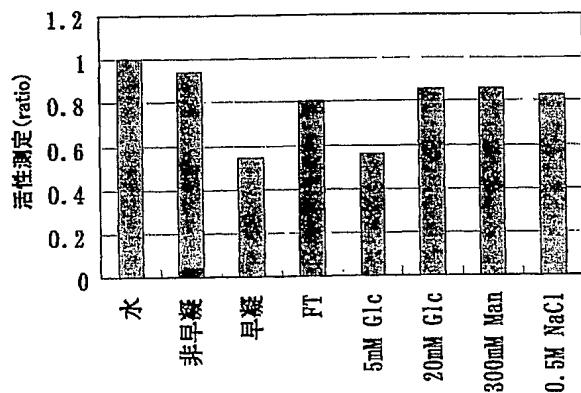


早凝因子D Sanzyme1000処理物のDEAE分画物の活性測定結果

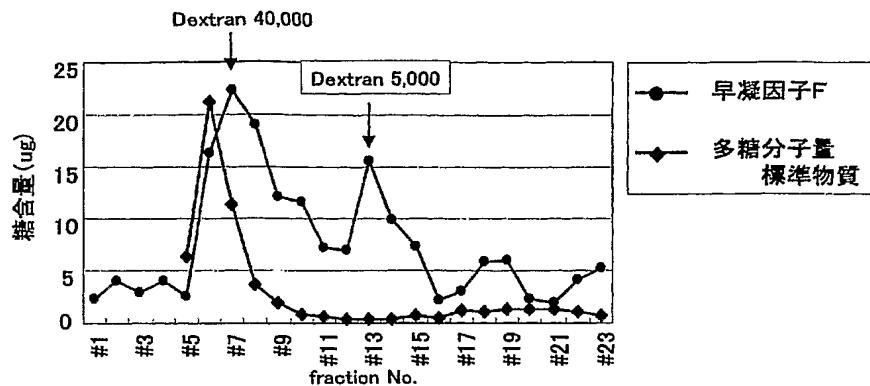
【図15】

早凝因子D Sanzyme1000処理物の
BioGel P10サイズ排除クロマトグラフィーと
得られた各フラクションの活性測定結果

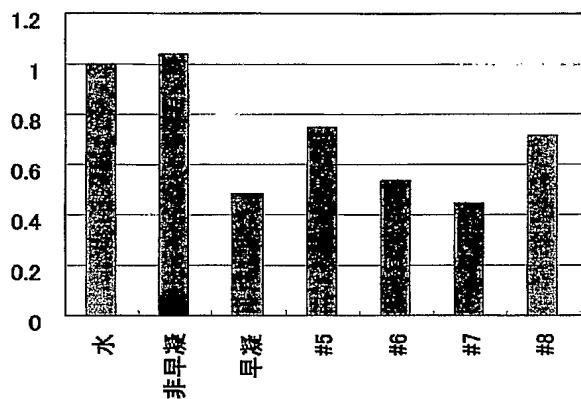
【図16】

早凝因子D Sanzyme1000処理物
DEAE分画0.6M画分のConA分画物活性測定結果

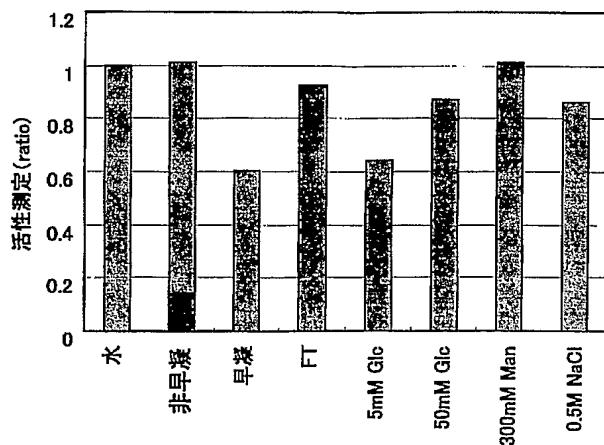
【図17】

早凝因子FのBioGel P100
サイズ排除クロマトグラフィー

【図18】

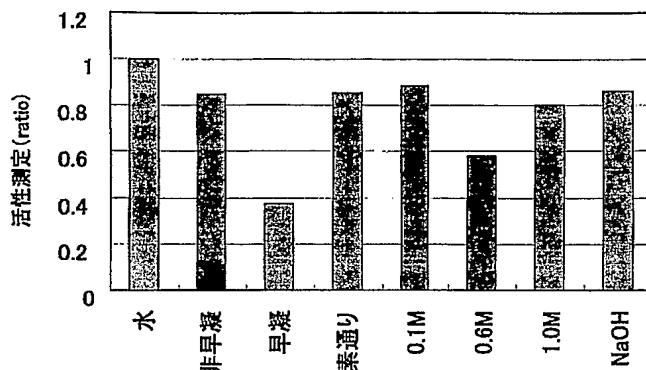
早凝因子FのBioGel P100サイズ排除クロマト
グラフィーにより得られた画分の活性測定結果

【図19】



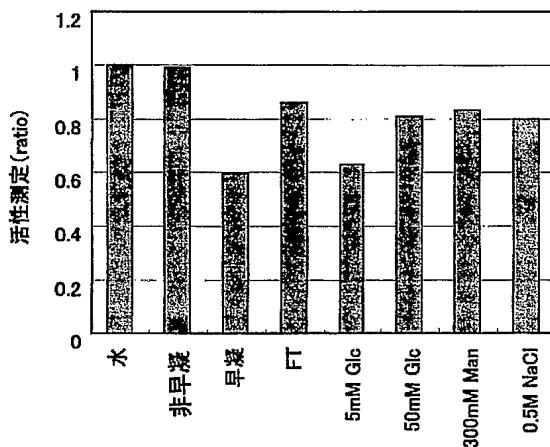
早凝因子F ConAカラム分画物の活性測定結果

【図20】



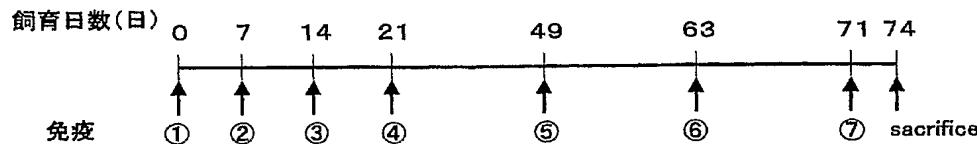
早凝因子F Sanzyme1000処理物の DEAE分画物の活性測定結果

【図21】



早凝因子F Sanzyme1000分解物の DEAE 0.6M NaCl画分ConA画分物の活性測定結果

【図22】



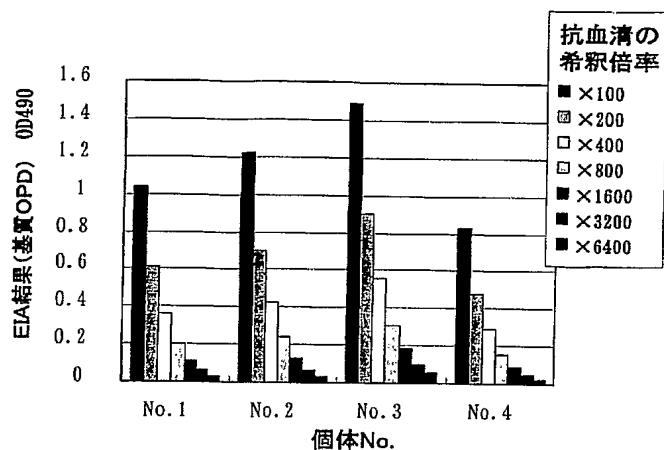
| 免疫 | 抗原量 | アジュバント | 投与経路 |
|----|---------|--------|-------|
| ① | 10 μg/匹 | FCA | 皮下・皮内 |
| ② | 10 μg/匹 | FICA | 皮下・皮内 |
| ③ | 10 μg/匹 | FICA | 皮下・皮内 |
| ④ | 10 μg/匹 | FICA | 皮下・皮内 |
| ⑤ | 5 μg/匹 | FICA | 皮下・皮内 |
| ⑥ | 5 μg/匹 | FICA | 皮下・皮内 |
| ⑦ | 5 μg/匹 | なし | 尾静脈 |

FCA: フロイント完全アジュバント(DIFCO社製)

FICA: フロイント不完全アジュバント(DIFCO社製)

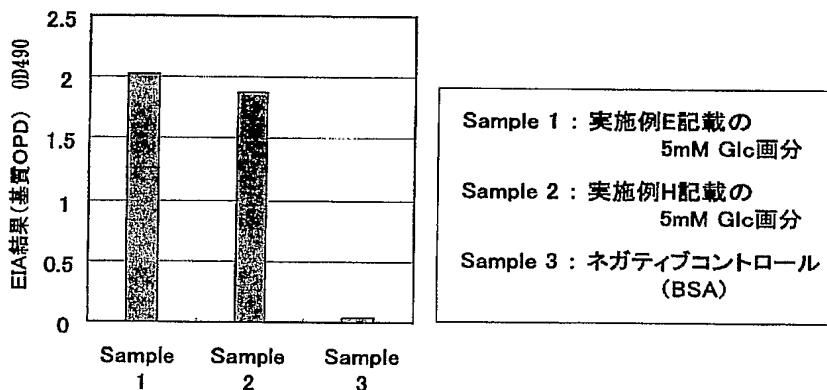
マウス免疫スケジュール

【図23】



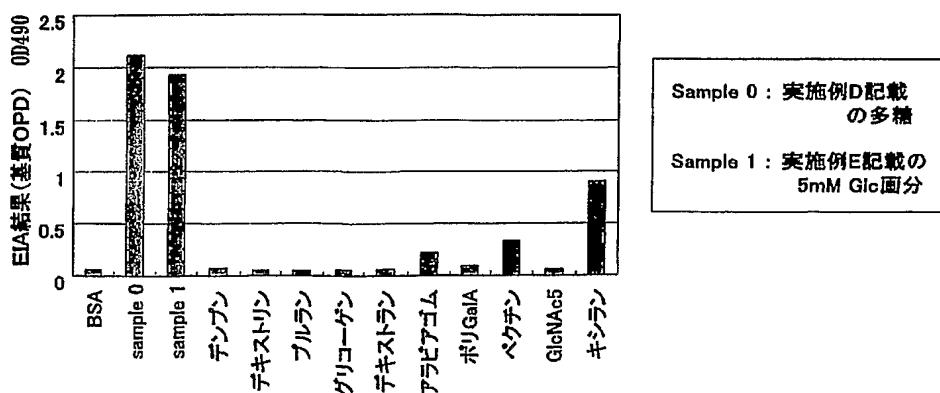
精製多糖を免疫したマウス抗血清のELISA評価

【図24】



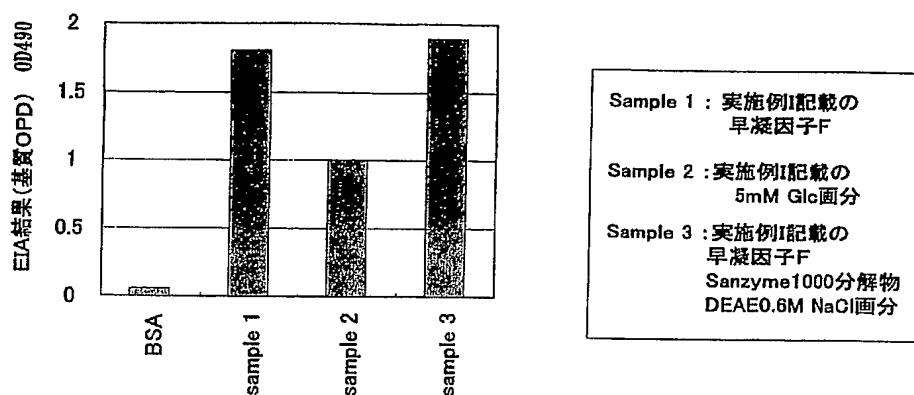
最終精製品のELISA評価

【図25】



得られたモノクローナル抗体と市販多糖との反応性

【図26】



得られたモノクローナル抗体と
早凝因子Fとの反応性

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 酿造原料中に含まれる早凝因子、その多糖類分解酵素分解物、それらの抗体及びそれらの用途を提供すること。

【解決手段】 大麦や麦芽等の醸造原料中に含まれる早凝因子（酵母早期凝集因子）を精製し、単離した。本発明の早凝因子は、ゲル濾過クロマトグラフィー法により、デキストラン40、000を標準多糖類とした場合の推定分子量が約80,000以下であり、かつ、少なくとも、 $(\rightarrow 4 X y 1 1 \rightarrow)$ 連結のキシロース単位、 $(\rightarrow 5 A r a 1 \rightarrow)$ 連結のアラビノース単位、 $(\rightarrow 3 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、 $(\rightarrow 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位、及び $(\rightarrow 3, 6 G a 1 1 \rightarrow)$ 連結のガラクトース単位を含有する多糖類からなる。本発明は、該早凝因子の酵素分解物、及びそれらの多糖類に対する抗体、及び、それらの発酵麦芽飲料等の醸造における利用方法を包含する。

認定・付加情報

| | |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2004-022739 |
| 受付番号 | 50400154740 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0094 |
| 作成日 | 平成16年 2月 2日 |

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

| | |
|----------|------------------|
| 【識別番号】 | 000253503 |
| 【住所又は居所】 | 東京都中央区新川二丁目10番1号 |
| 【氏名又は名称】 | 麒麟麦酒株式会社 |

【代理人】

| | |
|----------|----------------------------------|
| 【識別番号】 | 100107984 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 廣田 雅紀 |

【選任した代理人】

| | |
|----------|----------------------------------|
| 【識別番号】 | 100102255 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 小澤 誠次 |

【選任した代理人】

| | |
|----------|----------------------------------|
| 【識別番号】 | 100118957 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 岡 晴子 |

特願 2004-022739

出願人履歴情報

識別番号 [000253503]

1. 変更年月日 1995年 6月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区新川二丁目10番1号
氏 名 麒麟麦酒株式会社